

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE C MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
DEGRADATIVA DE CIANURO POR BACTERIAS
ALCALÓFILAS AISLADAS DE LOS RELAVES DE
LA PLANTA CONCENTRADORA DE METALES
MESAPATA CÁTAC - ANCASH**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Jonathan David Tuya Salas

Asesora

Mg. Susana Gutierrez Moreno

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, por todo el amor y apoyo que me brindaron y que me siguen brindando, y que pese sus circunstancias supieron darme lo necesario para terminar con esta etapa de mi vida, gracias papá y mamá. A mi amada esposa, gracias por tu paciencia, comprensión, ánimo y amor que me brindaste especialmente en la etapa final de mis estudios y la elaboración de este trabajo. A mi hermano; por cuidarme, aconsejarme y estar a mi lado en los momentos que más lo necesitaba. A mi asesora, quien nunca perdió la confianza en mí y siempre estuvo detrás para ayudarme y darme el ánimo para continuar con este trabajo. A Dios, por la vida y por poner en mi camino a todas estas personas maravillosas.

ABREVIATURAS

L:	Litro
mL:	Mililitro
dm ³ :	decímetro cúbico
mg:	Miligramo
g:	Gramo
Kg:	Kilogramo
°C:	grados centígrados
M:	Molar
rpm:	revoluciones por minuto
h:	hora(s)
pKa:	logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido
Ln:	logaritmo natural
pH:	potencial de hidrógeno
%:	Porcentaje
UFC:	unidad formadora de colonia
LMP:	límite máximo permisible
MINEM:	Ministerio de Energía y Minas
DS:	Decreto Supremo
OAS:	O-acetil-L-serina

INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 El cianuro	3
2.1.1 Terminología del cianuro	3
2.2 El cianuro en solución.....	5
2.2.1 Cianuro libre	5
2.2.2 Complejos de cianuro	7
2.2.3 Compuestos cianurados simples	7
2.2.4 Complejos débiles y fuertes de cianuro.....	8
2.2.5 Compuestos derivados del cianuro	8
2.2.5.1 Tiocianato	9
2.2.5.2 Cianato	9
2.2.5.3 Amoníaco.....	9
2.3 Fuentes del cianuro	10
2.3.1 Fuentes naturales	10
2.3.2 Fuentes antropogénicas.....	11
2.4 Toxicidad del cianuro.....	12
2.5 Degradación del cianuro en el ambiente.....	14
2.5.1 Degradación natural de los compuestos cianurados	14
2.5.2 Tratamientos fisicoquímicos de los compuestos cianurados	15
2.5.3 Tratamientos biológicos de los compuestos cianurados.....	17

2.5.3.1 Vías metabólicas enzimáticas para la degradación del cianuro	19
2.5.3.2 Condiciones requeridas para la degradación microbiana del cianuro	19
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	23
3.1 Hipótesis.....	23
3.2 Objetivos	23
3.2.1 General	23
3.2.2 Específicos.....	23
IV. METODOLOGÍA.....	24
4.1 Lugar de muestreo	24
4.2 Recolección de muestras.....	24
4.3 Enriquecimiento selectivo de bacterias degradadoras de cianuro.	25
4.4 Aislamiento e identificación de bacterias alcalófilas degradadoras de cianuro.....	26
4.5 Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos	26
4.6 Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro.....	27
4.7 Evaluación de la cinética de crecimiento y degradación del cianuro	27
4.8 Determinación del cianuro por volumetría	28
V. RESULTADOS	30
5.1 Selección e identificación de bacterias alcalófilas potencialmente degradadoras de cianuro	30

5.2 Evaluación de las condiciones óptimas de pH y concentración de cianuro	31
5.3 Cinética de crecimiento y degradación del cianuro	33
VI. DISCUSIÓN	40
6.1 Selección, aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de cianuro	40
6.2 Evaluación de las condiciones óptimas de pH y concentración de cianuro	41
6.3 Evaluación de la cinética de crecimiento y degradación del cianuro	43
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. RECOMENDACIONES	47
IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	48
X. ANEXOS.....	59

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Complejos cianurados	5
Tabla 2. Principales tratamientos fisicoquímicos para la eliminación del cianuro.....	16
Tabla 3. Ventajas y desventajas relacionadas la degradación biológica del cianuro.....	17
Tabla 4. Comparación de las investigaciones sobre la biodegradación del cianuro.....	18
Tabla 5. Categorías generales de las reacciones enzimáticas de degradación de cianuro.....	20
Tabla 6. Puntos de muestreo e identificación presuntiva de las cepas aisladas.	30
Tabla 7. Tolerancia de bacterias alcalófilas a diferentes concentraciones de cianuro.....	32
Tabla 8. Tolerancia de bacterias alcalófilas a diferentes valores de pH.....	33
Tabla 9. Resumen de resultados de los parámetros cinéticos.....	39
Tabla 10. Identificación microbiana mediante el sistema API 20NE.	61
Figura 1. Distribución del HCN y el CN ⁻ en una solución acuosa (pKa=9,24 a 25°C).....	6
Figura 2. Procesos de degradación natural de los compuestos cianurados.	14
Figura 3. Planta Concentradora Mesapata Cátac - Ancash, 2013 (3 552 metros de altitud).....	24
Figura 4. Puntos de muestreo en el pozo de relaves de la Planta Concentradora Mesapata, Cátac - Ancash, 2013.	25
Figura 5. Crecimiento microbiano y degradación del cianuro por las cepas: A) P-CIAN 2, B) P-CIAN 3 y C) P-KING 12.....	374
Figura 6. Crecimiento microbiano y degradación del cianuro por las cepas: D) P-KING 2, E) P-KING 5 y F) P-KING 8.	375

Figura 7. Crecimiento microbiano y degradación del cianuro por las cepas:	
G) P-NUT 1, H) P-NUT 6 y I) P-NUT 9.	376
Figura 8. Control de la biodegradación del cianuro en un cultivo	
sin inocular.	377
Figura 9. Porcentaje de biodegradación del cianuro por las cepas	
evaluadas.	377
Figura 10. Relación entre el crecimiento y biodegradacion del cianuro.	38
Figura 11. Coloración Gram de las cepas evaluadas	60

RESUMEN

El cianuro es una sustancia química que se utiliza en el ámbito industrial y minero. No obstante, también es considerado un toxico potencialmente letal. El cianuro es potente inhibidor del metabolismo celular y uno de los gases que contamina el ambiente atmosférico. La mayoría de tratamientos fisicoquímicos empleados para mitigar los efluentes cianurados son caros y/o insuficientes, por esta razón la utilización de microorganismos capaces de biodegradar el cianuro es una buena alternativa por los bajos costos operativos y alta eficiencia que presenta.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad biodegradativa de cianuro por bacterias alcalófilas. Se recolectaron 7 muestras de relave procedentes de la Planta Concentradora Mesapata (Cátac – Ancash). Se lograron aislar 25 cepas de las cuales tres (P-CIAN 2, P-NUT 1 y P-KING 2), obtuvieron los mejores rendimientos en las pruebas de selección, tolerando concentraciones de hasta 100 mg/L de CN^- a pH 11,0. Las cepas P-CIAN 2, P-NUT 1 y P-KING 2 obtuvieron velocidades de crecimiento de $0,063 \text{ h}^{-1}$; $0,039 \text{ h}^{-1}$ y $0,082 \text{ h}^{-1}$; y tasas de biodegradación de $0,472 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $0,688 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0,875 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. P-CIAN 2, P-NUT 1 y P-KING 2 fueron capaces de biodegradar una concentración de 100 mg/L de CN^- hasta en 77, 85 y 91%, respectivamente.

Solo las cepas P-NUT 1 y P-KING 2 pudieron ser identificadas como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Chromobacterium violaceum*, respectivamente.

Palabras clave: cianuro, efluentes mineros, bacterias alcalófilas, biodegradación, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*.

ABSTRACT

Cyanide is a chemical that is used in the industrial and mining sector. However, it is also considered a potentially lethal toxic. Cyanide is a potent inhibitor of cell metabolism and one of the gases that pollute the atmospheric environment. Most physicochemical treatments used to mitigate cyanide effluents are expensive and/or insufficient, for this reason the use of microorganisms capable of biodegrading cyanide is a good alternative for high efficiency and low operating costs presented.

The aim of this study was to evaluate the ability of cyanide biodegradative alkaliphilic bacteria. 7 samples of tailings from the concentrator plant Mesapata (Cátac-Ancash) were collected. It was possible to isolate 25 strains of which three (P-CIAN 2, P-NUT 1 and P-KING 2) obtained the best performance in the selection tests. They tolerated concentrations up to 100mg/L of CN^- to pH 11.0. The P-CIAN 2, P-NUT 1 and P-KING 2 strains obtained growth rates of 0.063 h^{-1} , 0.039 h^{-1} and 0.082 h^{-1} , and biodegradation rates of $0.472 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $0.688 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $0.875 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively. P-CIAN 2, P-NUT 1 and P-KING 2 were able to biodegrade a concentration of 100mg/L CN^- up to 77, 85 and 91% of CN, respectively.

Only strains P-NUT 1 and P-KING 2 could be identified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Chromobacterium violaceum*, respectively.

Key words: cyanide, mining effluent, biodegradation, alkaliphilic bacteria, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*.

I. INTRODUCCIÓN

El cianuro es el principal reactivo químico utilizado por la industria minera para la extracción y recuperación de metales como el oro, plata, plomo, cobre y zinc. También es empleado por otras industrias para la fabricación de diversos productos tales como papel, textiles, plásticos, medicamentos, etc. Anualmente se produce alrededor de 1,4 millones de toneladas de cianuro en el mundo (Logsdon *et al.*, 1999).

En nuestro país, hace poco más de una década, el cianuro de sodio (NaCN) era empleado por unas treinta plantas de cianuración en la recuperación del oro. En 1994 el Ministerio de Energía y Minas calculó un incremento de 165 %, entre 1995 y fines de siglo, en la aplicación de procesos de cianuración (Perú, MINEM, 1996).

El cianuro es una sustancia muy tóxica, que afecta a todas clase de células vivas ya sean de plantas, animales o microorganismos (Patil y Kulkarni, 2008). Cuando el cianuro se encuentra en soluciones con pH inferiores a 9,2 se produce la forma más tóxica del cianuro, el ácido cianhídrico (HCN) gaseoso (Dzombak *et al.*, 2006). Pese a la evidente peligrosidad de este compuesto, se estima que su uso se incremente en los próximos años ya que aún no existe un material sustituto que pueda ser equivalente en términos de eficiencia operacional, comercial y racionalidad ecológica, en comparación con materiales de mayor peligrosidad, como su predecesor el mercurio.

Actualmente, se utiliza una gran variedad de tratamientos físicos y químicos para eliminar y/o reducir los altos niveles de cianuro presente en los efluentes industriales. Sin embargo, muchos de estos tratamientos resultan ser insuficientes y caros, además de generar otros productos secundarios tóxicos, como ocurre con muchos de los métodos químicos empleados (Akcil *et al.*, 2003). Por esta razón la búsqueda de

tratamientos alternativos que sean más eficaces, baratos y amigables con el ambiente resultan ser de gran importancia e interés para muchas industrias (Baxter y Cummings, 2006).

A mediados de 1950 se comenzó a estudiar el uso de microorganismos capaces de biodegradar el cianuro (Pettet y Mills, 1954; Ware y Painter 1955). En la actualidad, existen muchas investigaciones que demuestran la capacidad de algunos microorganismos de utilizar el cianuro como fuente de nitrógeno y/o carbono (Knowles 1976; Raybuck, 1992; Dubey y Holmes 1995; Akcil *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2010). El empleo de microorganismos para tratar los efluentes cianurados proveniente de las industrias, ofrece una solución mucho más eficaz y barata que los tratamientos químicos y físicos convencionales (Nelson *et al.*, 1998).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 El cianuro

El término cianuro sirve para designar a una familia de compuestos químicos que se caracterizan por la presencia de un átomo de carbono enlazado a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple ($\text{-C}\equiv\text{N}$). Más generalmente, se llama cianuro a una variedad amplia de compuestos que contienen este grupo químico (Álvarez, 2005).

2.1.1 Terminología del cianuro

En general, las distintas especies que incorporan en su composición al ión cianuro pueden ser agrupadas en alguna de las siguientes clases:

- **Ión cianuro.** Este término se refiere únicamente al anión CN^- en solución.
- **HCN (molecular).** Es una molécula neutra a la que se denomina ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno. Al grupo formado por el ión cianuro y el ácido cianhídrico se le conoce como “cianuro libre”. Únicamente el HCN es volátil a partir de soluciones acuosas y sólo el CN^- tiene capacidad de formar complejos con distintos iones metálicos, por esta razón este ión es utilizado en aplicaciones industriales.
- **Compuestos simples de cianuro.** Son compuestos iónicos que se disocian directamente en el agua liberando un catión y un anión (CN^-). Son las sales que provienen de reacciones ácido-base como por ejemplo, el NaCN y KCN.

- **Compuestos complejos de cianuro.** Son compuestos iónicos que se disocian directamente en el agua liberando un catión y un anión que contiene al ión cianuro. El anión, denominado “complejo”, puede seguir disociándose, produciendo en última instancia un catión y varios aniones cianuro (por ejemplo, el $\text{Au}(\text{CN})_3^-$).
- **Organocianuros.** Corresponden a compuestos orgánicos que contienen el grupo ciano ($\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}$), se les denominan nitrilos o cianuros. Los nitrilos son producidos de forma natural o artificial. En esta clase podemos encontrar a las cianhidrinas, los glucósidos cianogénicos, el acetonitrilo, el acrilonitrilo, etc.
- **Cianuro Total (CNT):** Se denomina así a todos los compuestos de cianuro (disueltos o no) existentes en una solución acuosa.
- **Cianuro disociable en ácido débil o cianuro WAD (*Weak Acid Dissociable*):** Es un término analítico utilizado para designar a los compuestos de cianuro que se disocian bajo reflujo con un ácido débil, normalmente a pH 4,5.
- **Cianuro disociable en ácido fuerte o cianuro SAD (*Strong Acid Dissociable*):** Es otro término analítico utilizado para designar a compuestos cianurados que resisten el ataque de un ácido débil, pero se disocian en presencia de un ácido fuerte a bajo pH.
- **Compuestos derivados del cianuro (*Cyanide related compounds*).** Son compuestos esencialmente no tóxicos que proceden de las transformaciones de compuestos cianurados. Los más importantes son el tiocianato, el cianato, los iones nitrato, nitrito y el amoníaco.

2.2 El cianuro en solución

Entre los compuestos de cianuro presentes en las disoluciones y/o efluentes mineros u otros procesos de cianuración, figuran el cianuro libre, las sales alcalinotérreas y los complejos cianurados metálicos formados con oro, mercurio, cinc, cadmio, plata, cobre, níquel, hierro y cobalto (Smith y Mudder, 1991). Estos pueden clasificarse en cinco categorías generales (Tabla 1).

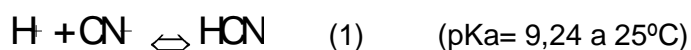
Tabla 1. Complejos cianurados

Clasificación	Compuesto
1. Cianuro Libre	CN^- , HCN
2. Cianuros Simples	
2.1. fácilmente solubles	NaCN , KCN , $\text{Ca}(\text{CN})_2$, $\text{Hg}(\text{CN})_2$
2.2. sales neutras insolubles	$\text{Zn}(\text{CN})_2$, $\text{Cd}(\text{CN})_2$, $\text{Cu}(\text{CN})$, $\text{Ni}(\text{CN})_2$, $\text{Ag}(\text{CN})$
3. Cianuros complejos débiles	$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Cd}(\text{CN})_3^{-1}$, $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$
4. Cianuros complejos moderadamente fuertes	$\text{Cu}(\text{CN})_2^{-1}$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$, $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Ag}(\text{CN})_2^{-1}$
5. Cianuros complejos fuertes	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Co}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Au}(\text{CN})_2^{-1}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

(Fuente: Smith y Mudder, 1991)

2.2.1 Cianuro libre

“Cianuro libre” es el término utilizado para describir tanto al anión CN^- que se disuelve en el agua del proceso, como al HCN que se forma en la solución. En los procesos de cianuración mineros, las briquetas sólidas de cianuro de sodio se disuelven en el agua para formar el catión Na^+ y el anión CN^- . El CN^- se puede combinar luego con el hidrógeno (H^+) para formar HCN molecular, según la reacción:



La medida en que esta reacción se desplace a uno u otro lado depende casi exclusivamente del pH de la solución (Figura 1). Si el pH no es muy elevado, la concentración de protones (H^+) en el agua será importante y la reacción (1) se encontrará desplazada a la derecha. Así, a valores de pH bajos, predominará el HCN (fase estable) sobre el CN^- . En cambio, si el pH es elevado, la concentración de protones será pequeña y la reacción (1) estará desplazada hacia la izquierda, predominando entonces la forma aniónica. En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,24 (Álvarez, 2005; Dzombak *et al.*, 2006).

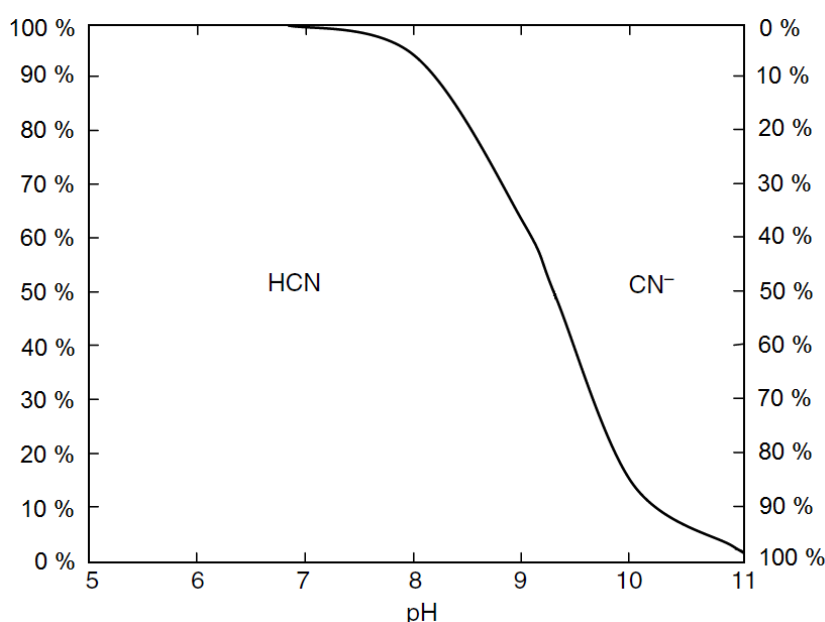


Figura 1. Distribución del HCN y el CN^- en una solución acuosa ($pK_a=9,24$ a $25^\circ C$)

(Fuente: Dzombak *et al.*, 2006)

Sólo el CN^- forma complejos con metales y únicamente el HCN es volátil a partir de soluciones acuosas, por esta razón los procesos de cianuración deben operar a pH alcalinos; de otra forma el CN^- se perdería por volatilización, ya que el punto de ebullición del HCN es de $25,7^\circ C$ (Smith y Mudder, 1991). Así, con el fin de retener el cianuro en la solución y controlar las emisiones de CN^- en el lugar de trabajo, se agrega cal para mantener el pH de la solución mayor a 10,5 (Álvarez, 2005).

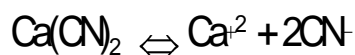
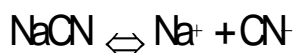
2.2.2 Complejos de cianuro

Aunque el cianuro se utiliza principalmente en la lixiviación del oro, también es capaz de reaccionar con otros metales. El mineral aurífero casi siempre contiene otros metales, entre ellos hierro, cobre, zinc, níquel y plata, así como otros elementos, como el arsénico (Logsdon *et al.*, 1999).

Los metales pueden formar complejos estables de cianuro en presencia de un exceso de CN^- . La formación de complejos se limita casi totalmente a los metales de transición del bloque “d” de la tabla periódica y sus vecinos como son Zn, Cd y Hg (Cotton y Wilkinson, 1972). Se sabe que 28 elementos en diferentes estados de oxidación, pueden formar 72 complejos con el cianuro. El grado de formación de complejos solubles está determinado por la concentración de CN^- . Algunos complejos son muy estables, mientras que otros se destruyen fácilmente (Álvarez, 2005).

2.2.3 Compuestos cianurados simples

Los cianuros simples pueden definirse como sales del ácido cianhídrico (p. ej. KCN, NaCN, $\text{Ca}(\text{CN})_2$), que se disuelven completamente en disolución acuosa produciendo cationes alcalinos libres y el anión cianuro, por ejemplo:



Los cianuros simples son eléctricamente neutros y son idóneos para existir en forma sólida. Los compuestos cianurados simples son solubles en agua y se disocian o se ionizan fácilmente y por completo para producir cianuro libre y el ion metálico (Smith y Mudder, 1991).

2.2.4 Complejos débiles y fuertes de cianuro

Los complejos débiles de cianuro, con frecuencia denominados cianuros “disociables en ácidos débiles” o cianuros WAD, pueden disociarse en solución y producir concentraciones ambientalmente significativas de cianuro libre. Por otra parte, los complejos fuertes de cianuro (“disociables en ácidos fuertes” o cianuros SAD) se degradan mucho más lentamente que el cianuro WAD en condiciones químicas y físicas normales.

Los complejos débiles incluyen complejos de cianuro de cadmio, cobre y zinc, entre otros. Al igual que ocurre en el caso de la formación del ácido cianhídrico, el grado en que se disocian estos complejos depende en gran medida del pH de la solución. Los complejos de cianuro con oro, plata, cobalto y hierro son fuertes y estables en solución. Esta estabilidad del complejo oro-cianuro es un factor clave en el uso del cianuro para la extracción del oro del mineral. Una vez que el oro entra en solución ligado al cianuro, permanece complejado con el cianuro hasta que las condiciones del proceso se cambian con el fin de recuperarlo en forma de metal. El hierro está virtualmente presente en todos los materiales geológicos: así, para la gran mayoría de las condiciones de operación en plantas de cianuración, los complejos fuertes de cianuro son predominantemente cianuros de hierro, ferri y ferrocianuros (Álvarez, 2005).

2.2.5 Compuestos derivados del cianuro

Como resultado de la cianuración, de la degradación natural o del tratamiento de agua residual, se forman una diversidad de compuestos en disolución, relacionados con el cianuro, entre los que figuran el tiocianato, el cianato y el amoníaco.

2.2.5.1 Tiocianato

El tiocianato (SCN^-) se forma por la reacción entre el ión cianuro, el oxígeno y sustancias que contienen azufre, resultando ser mucho menos tóxico que el cianuro. Los tiocianatos son más estables que los cianatos y que el ión cianuro en solución acuosa.

El tiocianato puede degradarse lentamente debido a la acción de diversos microorganismos, los cuales lo oxidan formando amoníaco y sulfato. Ciertos organismos tienen la capacidad de utilizar el tiocianato como una fuente de nitrógeno, lo cual ocurre sólo después de agotarse todo el amoníaco disponible. Los mecanismos de descomposición química de este compuesto son lentos; además, el tiocianato es resistente a la fotodegradación (Smith y Mudder, 1991).

2.2.5.2 Cianato

El cianato (CNO^-) es un producto generado durante el procesamiento de minerales, debido a la reacción entre el ión cianuro y el oxígeno, o durante el tratamiento de efluentes que contienen cianuro por medio de un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno, el ión hipoclorito o algunos otros. El cianato es estable en condiciones básicas pero se descompone en medio ácido para generar iones amonio (Gómez, 2012).

2.2.5.3 Amoníaco

A temperatura ambiente, el cianato y el tiocianato reaccionan lentamente con agua para formar amoníaco (NH_3), anión formiato y/o carbonato (Smith y Mudder, 1991). El NH_3 puede formar complejos metálicos con el cobre y el níquel, pero en las

concentraciones en las que se presenta en los efluentes del procesamiento de minerales auríferos, no compite eficazmente con el cianuro o con el tiocianato como agente para la formación de complejos.

El amoníaco libre es tóxico para la mayoría de los seres vivos. Este compuesto se volatilizará en el aire a un nivel elevado de pH, pero permanecerá en solución, al igual que el ión amonio, en condiciones neutras de pH. Los principales mecanismos de eliminación del amoníaco en el ambiente acuático son la nitrificación biológica, eliminación por las plantas y la adsorción en las arcillas (Álvarez, 2005).

2.3 Fuentes del cianuro

El carbono y el nitrógeno, los dos elementos que forman el cianuro, están presentes a nuestro alrededor. Juntos forman casi el 80% del aire que respiramos y ambos están presentes en las moléculas orgánicas que son la base de todas las formas de vida. El cianuro de hidrógeno se formó en las primeras etapas del desarrollo de nuestro planeta como precursor de los aminoácidos, a partir de los cuales evolucionó la vida sobre la tierra (Logsdon *et al.*, 1999). El cianuro se produce de forma natural en la biósfera y además es sintetizado y utilizado en una gran variedad de industrias.

2.3.1 Fuentes naturales

La síntesis biológica de cianuro (cianogénesis), fue descubierta por primera vez en plantas en 1802. En la actualidad se sabe que los compuestos cianogénicos pueden encontrarse en más de 3 000 especies de plantas, animales, algas, bacterias y hongos. En la mayoría de los organismos, el cianuro se utiliza como un mecanismo para regular procesos bioquímicos específicos (Dzombak *et al.*, 2006).

Aproximadamente 2 650 especies de plantas, pertenecientes a alrededor de 550 géneros y más de 130 familias, producen cantidades significativas de glucósidos cianogénicos que se almacenan en vacuolas celulares (Lechtenberg y Nahrstedt, 1999). Entre las plantas se encuentran cultivos de gran importancia económica como la alfalfa, el sorgo, la linaza, el bambú, la papa, el algodón y el frijol, así como diferentes árboles frutales (Luque-Almagro, 2006; Dzombak *et al.*, 2006). En el reino animal la síntesis biológica de cianuro está restringida a artrópodos; algunos centípedos, milípedos e insectos (coleópteros, heterópteros y lepidópteros) capaces de producir cianuro (Duffey, 1981; Nahrstedt, 1988).

En bacterias, la cianogénesis se encuentra limitada a *Chromobacterium violaceum* y varias especies del género *Pseudomonas* (*P. chlorophis*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*) (Dubey y Holmes, 1995). En estos microorganismos la biosíntesis de cianuro tiene lugar durante la transición de la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria, lo que indica que este proceso forma parte del metabolismo secundario (Askeland y Morrison, 1983; Knowles, 1976). Sólo algunas algas (*Chlorella vulgaris*, *Anacystis nidulans*, *Nostoc muscorum* y *Plectonema boyanum*) son capaces de producir cianuro (Dubey y Holmes, 1995). Aproximadamente 300 especies de hongos, pertenecientes a 52 géneros, son cianogénicos (Luque-Almagro, 2006).

2.3.2 Fuentes antropogénicas

El cianuro se utilizó comercialmente por primera vez en 1889 en Nueva Zelanda, en la extracción y recuperación de oro y plata. Debido a sus características químicas, disponibilidad, efectividad y costo, actualmente este compuesto se utiliza ampliamente en diversos tipos de industrias y es considerado esencial en el mundo moderno (Logsdon *et al.*, 1999). Las principales formas de cianuro producidas por el hombre son el cianuro de hidrógeno gaseoso, el cianuro sólido de sodio y el cianuro de potasio

(Mudder y Botz, 2004). Las industrias mineras emplean típicamente soluciones de NaCN entre 100 a 500 mg/L (Logsdon *et al.*, 1999).

Anualmente se utiliza más de un millón de toneladas de cianuro, que representan el alrededor del 80% de la producción total, en la producción de químicos orgánicos, como nitrilos, nylon y plásticos acrílicos, así como en la fabricación de pinturas, adhesivos, cosméticos, colorantes, medicamentos, insecticidas, agentes quelantes, etc. Otras aplicaciones industriales incluyen la galvanoplastia, endurecimiento del acero. El 20% restante de la producción de cianuro es empleado en la fabricación de cianuro de sodio, muy utilizado en la minería de todo el mundo (Logsdon *et al.*, 1999).

2.4 Toxicidad del cianuro

El cianuro, a pesar de ser un producto químico industrial indispensable, es conocido por sus características tóxicas potencialmente mortales. La toxicidad del cianuro depende básicamente de su forma química, su estabilidad y su biodisponibilidad (Kunz y Casey, 1980). La forma más tóxica es el cianuro libre (HCN y CN^-), y las menos tóxicas son los complejos cianurometálicos fuertes (Dubey y Holmes, 1995). Existen al menos tres mecanismos conocidos de toxicidad para el cianuro: (a) quelación con metales di o trivalentes en los sitios activos de las metaloenzimas, (b) reacción con bases Schiff intermediarias para formar derivados de nitrilo estables y (c) la formación de cianhidrinas por reacción con grupos ceto (Solomonson, 1981).

La principal metaloenzima afectada en los seres vivos es la citocromo oxidasa, enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, esencial para la utilización del oxígeno durante la respiración celular. La inhibición de esta enzima bloquea la fosforilación oxidativa, disminuyendo la concentración de ATP en la célula y provocando la muerte celular (Donato *et al.*, 2007). El cianuro, también puede inhibir la actividad de otras

enzimas como la catalasa, la peroxidasa, la fosfatasa, la ribulosa 1,5 bisfosfato (Rubisco) (Vasil'ev *et al.*, 2007).

En microorganismos, además de inhibir el crecimiento, se ha descrito que el cianuro altera la morfología celular en *Bacillus pumillus*, modifica la motilidad de *Spirillum volutans*, aumenta el tiempo de generación de *E. coli* y causa mutaciones en *Neurospora crassa* (Dubey y Holmes, 1995). En plantas, el cianuro es capaz de inhibir la fotosíntesis (Wishnick y Lane 1969, Vasil'ev *et al.*, 2007). En animales y humanos el cianuro puede ser absorbido por la piel, ingerido o inhalado. Posteriormente, el cianuro es distribuido por todo el cuerpo a través de la sangre, provocando hipoxia citotóxica en todos los tejidos. Uno de los principales órganos sobre los que actúa el cianuro es el sistema nervioso central. Debido a la importancia de la respiración celular en este órgano, su inhibición provoca graves alteraciones neurológicas, ocasionando en último término la muerte del individuo. Concentraciones de HCN de 200 mg/L son letales para muchos animales (Montenegro, 2003). La dosis letal para humanos es, en caso que sean ingeridos, de 1 a 3 mg/Kg del peso corporal; en caso sea absorbido, de 100 a 300 mg/Kg; y de 100 a 300 mg/L si son inhalados (Ruiz, 2004). En ambientes acuáticos, concentraciones muy bajas como 0,1 mg/L afectan la biota más sensible, peces y aves migratorias (Henny *et al.*, 1994). Por lo tanto, el cianuro y sus derivados pueden afectar la biodiversidad y la biomasa activa del ecosistema, provocando graves problemas en el ambiente.

Con el fin de proteger la salud de la población y el ambiente, la mayoría de los países han establecido límites estrictos de concentración de cianuro sobre las aguas destinadas al consumo humano y los efluentes de ciertos sectores de producción. En nuestro país, los LMP de cianuro en aguas de consumo es de 0,070 mg/L (DS N° 031-2010-SA) y en los efluentes de las actividades Minero-Metalúrgicas es de 1 mg/L de Cianuro Total (DS N° 010-2010-MINAM).

2.5 Degradación del cianuro en el ambiente

2.5.1 Degradación natural de los compuestos cianurados

Por ser un compuesto natural, el cianuro es biodegradable (Knowles, 1976). Los procesos de degradación natural pueden reducir a largo del tiempo la concentración de las formas tóxicas del cianuro en soluciones a valores muy bajos. El principal mecanismo de degradación natural del cianuro es la volatilización, con posteriores transformaciones atmosféricas a sustancias químicas menos tóxicas. Otros factores como la oxidación biológica, la hidrólisis, la precipitación y los efectos de la luz solar (fotólisis), también contribuyen a la degradación del cianuro (Figura 2). En algunos casos, la combinación de estos procesos de degradación natural son suficientes para satisfacer los requisitos que reglamentan la descarga de soluciones que contienen cianuro (Longdon *et al.*, 1999).

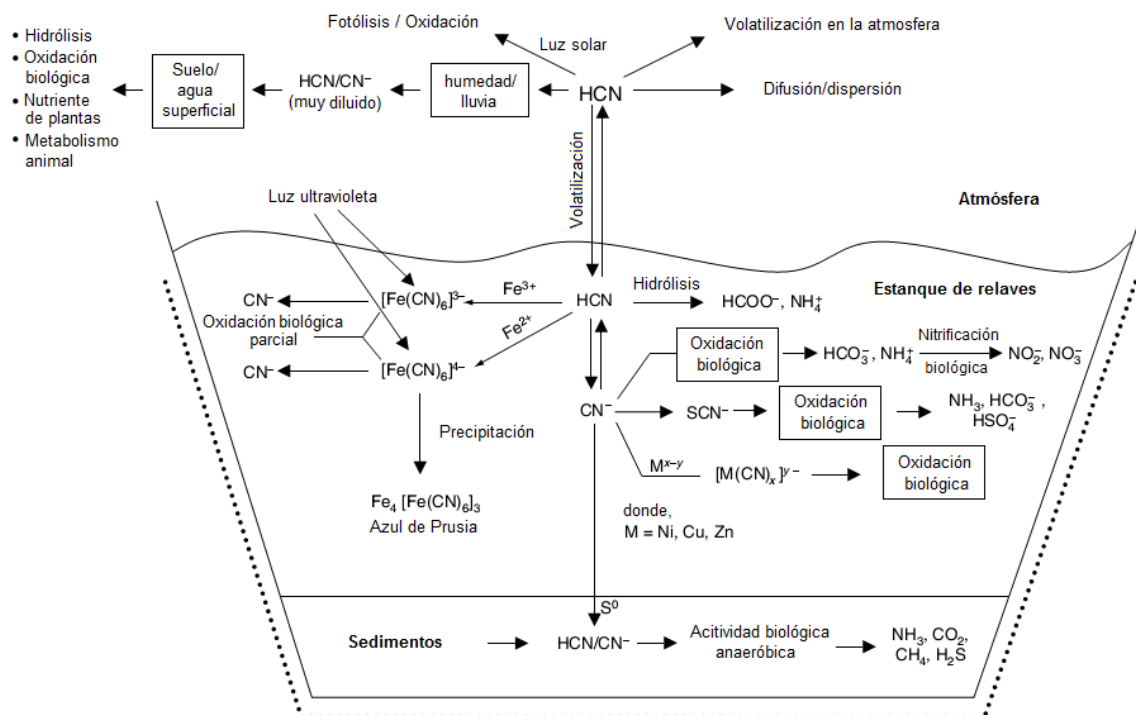


Figura 2. Procesos de degradación natural de los compuestos cianurados.

(Fuente: Dzombak *et al.*, 2006)

A pesar de que estos procesos son efectivos, no siempre tienen una cinética tan rápida como para ser considerados en propósitos industriales (20 mg/L de cianuro total puede degradarse en aproximadamente 100 días), por lo que es necesario trabajar con otros sistemas de detoxificación (Longdon *et al.*, 1999). Además, los porcentajes de degradación varían según las formas y concentraciones del cianuro, la temperatura, el pH, la población microbiana presente, la exposición a la luz, etc.; por lo que resulta difícil de medir y controlar (Álvarez, 2005).

2.5.2 Tratamientos fisicoquímicos de los compuestos cianurados

Los efluentes industriales mineros contienen típicamente concentraciones entre 0,1 a 100 mg/L de CNT, mientras que en efluentes de industrias galvanoplásticas pueden encontrarse concentraciones de cianuro entre 0,1 a 1000 mg/L de CNT (Patil y Kulkarni, 2008). Actualmente existen muchos tratamientos fisicoquímicos para tratar los residuos cianurados, entre ellos están la cloración alcalina, ozonización, precipitación, acidificación, oxidación electrolítica, el proceso INCO (con SO₂/aire), peróxido de hidrogeno, ácido de Caro, absorción con carbón activado, ósmosis reversa, hidrólisis térmica, etc. (Botz *et al.*, 2005). La selección del tratamiento más apropiado y económico depende de muchos factores tales como: las características fisicoquímicas del efluente, la cantidad del efluente a tratar, la matriz del efluente, la calidad de tratamiento requerida, el costo y otros factores relacionados al efluente (Dzombak *et al.*, 2006). En la Tabla 2 se describe brevemente los principales tratamientos que se emplean para la eliminar el cianuro del ambiente.

Muchos de estos métodos resultan ser muy efectivos para remover el cianuro; sin embargo, algunos son muy caros y/o difíciles de operar. Además, en muchos casos no se llega a eliminar completamente el cianuro y en otros se requieren de tratamientos adicionales. En vista de estas limitaciones, existe una necesidad de desarrollar

tratamientos alternativos capaces de producir altos niveles de degradación del cianuro a un bajo costo (Nelson *et al.*, 1998; Akcil, 2003).

Tabla 2. Principales tratamientos fisicoquímicos para la eliminación del cianuro.

Tratamiento	Ventaja	Desventaja	Remueve				¿Requiere tratamiento adicional?
			CN ⁻ libre	Tiocianato	Cianuro WAD (complejo metal)	Cianuro SAD (complejo metal)	
Clorinación alcalina	Tecnología establecida. El cianuro se oxida a CO ₂ y N ₂ a pH bajo. Remueve metales por precipitación a pH elevados.	Se adicionan cationes/aniones al agua. Exceso de hipoclorito toxico. La clorinación puede reaccionar con compuestos orgánicos. Genera productos tóxicos intermediarios.	Si	Si	Si	No	Si
Peróxido de hidrogeno	El exceso se descompone a H ₂ O y O ₂ . Simple de operar. No reacciona con el Tiocianato.	Costoso. Puede precipitar si precipitan ferricianuros con cobre. Requiere dosis exactas.	Si	No	Si	Algo	Si
SO₂/aire (INCO)	El reactivo es barato. Se usa sobre un amplio rango de pH.	Agrega sulfatos al proceso. Puede precipitar si precipitan ferricianuros con cobre.	Si	Algo	Si	Si	Poco
Ozonización	Es posible alguna regeneración del cianuro.	Produce amonio. Altamente costo.	Si	Si	Si	No	Si
Oxidación anódica	Trata todos los efluentes sin importar su concentración.	Requiere tratamiento adicional por oxidación.	Si	Si	Si	No	Si
Electrodialisis	Altamente eficiente.	Muy costoso. Aplicable a cierto tipo de efluentes.	Si	Si	Si	Si	No
Ósmosis reversa	Tratamiento eficiente.	Costoso. Aplicable a cierto tipo de efluentes.	Si	Si	Si	Si	No
Hidrólisis	Metodología simple.	Se requieren altas temperaturas. Produce HCN. Requiere mucho ácido.	Si	No	No	No	Si
Carbón activado	Método muy efectivo.	Costoso. Solo para bajas concentraciones. Se requiere pre tratamiento.	No	Algo	Mucho	Si	Poco
Resina	Eficiente	Se requiere pre tratamiento. Difícil de sustituir.	Algo	Algo	Si	Si	Poco
Acido de Caro	Útil en el sitio de tratamiento. Se usa donde el proceso INCO no es posible.	Tecnología no establecida. No aplicable para todos los sitios. Aplicación limitada.	Si	Si	Si	Algo	Poco
Fotólisis	Proceso efectivo. No se producen productos indeseables. Remoción completa.	Requiere alta energía. Dificultad para operar. Muy costoso.	Si	Si	Si	Si	Si

(Fuente: Dash *et al.*, 2008)

2.5.3 Tratamientos biológicos de los compuestos cianurados

En comparación con la degradación natural y los métodos fisicoquímicos, los tratamientos biológicos son más rápidos, económicos y eficientes ya que requieren poco capital, bajos costos operativos y no produce productos intermediarios tóxicos (Akcil *et al.*, 2003; Dash *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 1998). En la Tabla 3 se resume los beneficios y aplicaciones del tratamiento biológico.

Tabla 3. Ventajas y desventajas relacionados la degradación biológica del cianuro.

Tratamiento	Ventaja	Desventaja	Remueve				¿Requiere tratamiento adicional?
			CN ⁻ libre	Tiocianato	Cianuro WAD (complejo metal)	Cianuro SAD (complejo metal)	
Oxidación biológica / Biodegradación	Aprovecha un proceso natural. Puede tratar CN ⁻ sin generar otro tipo de desecho. No requiere el uso de químicos o controles extensos. El costo es fijado por el volumen a tratar. Es amigable con el ambiente.	La tecnología no está totalmente establecida. Requiere la combinación de la metalurgia, biología y procesos de ingeniería. Se requieren evaluaciones y estudios específicos para cada tipo y sitio. No remueve concentraciones altas.	Si	Si	Si	Si	No

(Fuente: Dash *et al.*, 2008)

Las transformaciones biológicas envuelven procesos de biodegradación y asimilación del cianuro en formas de aminoácidos, tiocianato, β -cianolanina y vitaminas por plantas y microorganismos (Gupta *et al.*, 2010). La biodegradación hace referencia a las reacciones que convierten el cianuro a moléculas orgánicas o inorgánicas más simples, las cuales pueden ser fácilmente metabolizadas a amonio y dióxido de carbono o metano. Las vías de biodegradación son utilizadas principalmente por organismos procariotas y probablemente representan una de las primeras respuestas evolutivas a la presencia de cianuro en el ambiente. La asimilación hace referencia a la incorporación del cianuro directamente en compuestos orgánicos. Las vías de asimilación están presentes tanto en procariotas como en eucariotas (Dzombak *et al.*, 2006). Todas las vías (degradativas o asimilativas) dependen de los mecanismos de

tolerancia al cianuro que presenten los microorganismos. Entre estos mecanismos de tolerancia se encuentran: a) la existencia de rutas de degradación de cianuro y b) la presencia de una cadena de transporte de electrones insensible a cianuro (Luque-Almagro, 2006). Actualmente se pueden encontrar en la literatura numerosas investigaciones sobre degradación microbiana del cianuro y derivados (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de las investigaciones sobre la biodegradación del cianuro.

Compuesto a ser removido	Microorganismo	Parámetros dependientes			Referencias
		Concentración	pH	T (°C)	
Cianuro WAD	<i>Pseudomona sp.</i> (CM5, CMN2)	100-400 mg/L	9,2-11,4	30	Akcil <i>et al.</i> , 2003
Cianuro de Potasio	<i>Fusarium solani</i>	0,5-0,8 mM	9,2-10,7	30	Dumestre <i>et al.</i> , 1997
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>Pseudomona fluorescens</i>	-	4,0-7,0	25-35	Dursun y Akzu, 2000
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>P. fluorescens</i>	100 mg/L	5,0	25	Dursun <i>et al.</i> , 1999
Cianuro de Potasio	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,58 mM	7,0	30	Kao <i>et al.</i> , 2003
Nitrilos	<i>K. oxytoca</i>	25-100 mM	7,0	30	Kao <i>et al.</i> , 2006
Cianuros	Cultivo mixto	20 mg/L	7,0	22	White y Schnabel, 1998
Cianuro de Sodio	<i>Pseudomona putida</i> inmovilizada	100-400 mg/L	6,7	25	Babu <i>et al.</i> , 1992
Cianuro de Sodio, cianatos y tiocianatos	<i>P. putida</i> inmovilizada	4 mM	7,5	25	Chapatwala <i>et al.</i> , 1998
Cianuro y formamida	<i>Fusarium oxysporum</i> inmovilizada	1-7 mM	8,0	25-30	Campos <i>et al.</i> , 2006
Cianuro metálico	<i>Trichoderma sp.</i>	2000 mg/L	6,5	25	Ezzi-Mufaddal y Lynch, 2002
Fenol y cianuro	<i>P. putida</i> inmovilizada	-	-	27	Konwalska <i>et al.</i> , 1998
Cianuro de cobre y zinc	<i>Citrobacter sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i>	52 mg/L	7,5	35	Patil y Paknikar, 2000
Tetra-ciano-nickelato (II)	<i>P. fluorescens</i> inmovilizada	26 mg/L	-	30	Suh <i>et al.</i> , 1994
Cianuro de Potasio	<i>Burkholderia Capita</i> cepa C-3	10 mM	8,0-10,0	30	Adjei y Ohta, 2000
Cianuro de Potasio	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	Castric y Strobel, 1969
Cianuro de Potasio	<i>Bacillus pumillus</i> C1	100 mg/L	10,5	30	Meyers <i>et al.</i> 1991
Cianuro de Potasio	<i>Escherichia coli</i> BCN6	50, 100, 200 mg/L	9,2	30	Figueira <i>et al.</i> , 1996
Cianuro de Potasio	<i>Stemphilium loti</i>	2 mM	6,5-7,5	25	Fry y Miller, 1972
Fenol, CN, $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$	<i>P. fluorescens</i> NCIB11764	25, 26 mM/dm ³	-	30	Kang y Park 1997
Cianuro de Potasio	<i>S. loti</i> , <i>G. Sorgi</i>	70 mM	7,0; 5,0-5,7	28, 35	Nazly <i>et al.</i> , 1983
Tetra-ciano-nickelato cianuro de potasio	<i>P. putida</i> BCN3	-	-	30	Silvos-Aviles <i>et al.</i> , 1990
Cianuro de Potasio	<i>B. pumilis</i>	2,5 M	8,0-9,0	40	Skowronski y Strobel, 1969
Cianuro de Potasio	<i>P. acidovorans</i>	31 mg/L	7,1; 7,9 y 9,1	30	Shivaraman y Parhad, 1985
Cianuro de Potasio	<i>K. oxytoca</i>	3 mM	7,0	30	Chen <i>et al.</i> , 2008
Cianuro de Potasio	<i>P. stutzeri</i> AK61	1 mM	7,6	30	Watanabe <i>et al.</i> , 1998
Cianuro de Sodio	<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	2 mM	9,5	30	Luque-Almagro <i>et al.</i> , 2005
Tetra-ciano-nickelato (II)	<i>Cryptococcus humicola</i> MCN2	51 mM	7,5	25	Kwon <i>et al.</i> , 2002

(Fuente: Dash *et al.*, 2008)

Los microorganismos envueltos en los tratamientos biológicos del cianuro y compuestos cianurados incluyen usualmente una mixtura heterogénea de bacterias y hongos, encontrados comúnmente en el suelo y adaptados por exposición continua a estos compuestos (Mudder *et al.*, 2001). Sin embargo, la biodegradación del cianuro es una propiedad intrínseca de ciertos microorganismos y no requiere necesariamente de una exposición previa para inducir esta propiedad (Patil y Paknikar, 2000).

2.5.3.1 Vías metabólicas enzimáticas para la degradación del cianuro

Se han estudiado cinco vías metabólicas generales para la biodegradación/asimilación del cianuro: hidrolíticas, oxidativas, reductivas, sustitución/transferencia y de síntesis (Tabla 5). Las primeras tres son vías degradativas en las cuales las enzimas catalizan la conversión del cianuro en moléculas más simples (p. ej. formamida, ácido fórmico y amoníaco) que luego pueden ser asimiladas como fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento. Las últimas dos son vías asimilativas en las cuales los microorganismos utilizan el cianuro como fuente de carbono y/o nitrógeno para la formación de metabolitos primarios tales como aminoácidos o precursores (Gupta *et al.*, 2010; Dzombak *et al.*, 2006). Algunos microorganismos (p. ej. *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus megaterium* y *E. coli*), pueden utilizar más de una vía metabólica para biodegradar el cianuro. El uso de cierta vía metabólica está determinado por condiciones externas como el oxígeno, el pH y la concentración, biodisponibilidad y solubilidad de cianuro en el agua y/o suelo (Ebbs, 2004).

2.5.3.2 Condiciones requeridas para la degradación microbiana del cianuro

La degradación microbiana envuelve reacciones enzimáticas y condiciones específicas de concentración de cianuro, niveles de oxígeno, temperatura, pH, nutrientes disponibles, iones metálicos etc. (Baxter y Cummings, 2006; Gupta *et al.*, 2010).

Tabla 5. Categorías generales de las reacciones enzimáticas de degradación del cianuro.

Reacciones Hidrolíticas	Microorganismos
Cianuro hidratasa $\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$	<i>Gloeocercospora sorghi</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> CCM1 876, <i>Fusarium solani</i> IHEM 8026, <i>Sternphylium loti</i> .
Nitrilo hidratasa $\text{R-CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CONH}_2$	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Pseudonocardia thermophila</i> , <i>Pseudomonas marginales</i> MA32, <i>P. putida</i> MA113, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Brevibacterium imperialis</i> CBS489-74.
Cianidasa $\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{NH}_3$	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> , <i>Bacillus pumillus</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> .
Nitrilasa $\text{R-CN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-COOH} + \text{NH}_3$	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Nocardia</i> sp.
Tiocianato hidrolasa $\text{SCN}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COS} + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$	<i>Thiobacillus thioparus</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Acremonium strictum</i> .
Reacciones Oxidativas	
Cianuro monooxigenasa $\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{HCONH}_2 + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$	<i>Pseudomonas</i> sp.
Cianuro dioxigenasa $\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NAD(P)}^+$	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB11764, <i>E. coli</i> BCN6, <i>Bacillus pumillus</i> .
Cianasa $\text{SCN}^- + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CNO}^- + \text{HS}^- \rightarrow \text{HS}^- + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+$ \downarrow $\text{CNO}^- + 3\text{H}^+ + \text{HNO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{CO}_2$	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.
Reacciones Reductivas	
Nitrogenasa $\text{HCN} + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_2=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2=\text{O}$ \downarrow $\text{CH}_2=\text{NH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_3-\text{NH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + \text{NH}_3$	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> , <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Azotobacter</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp., <i>Rhodospirillum rubrum</i>
Reacciones Sustitución/Transferencia	
Rodanasa (Cianuro sulfurotransferasa) $\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ferrobacillus ferrooxidans</i> , <i>Thermobacillus denitrificans</i> , <i>Desulfotomaculum nitrificans</i> , <i>Fusarium</i> sp.
Mercaptopiruvato sulfurotransferasa Pasos $\text{HSCH}_2\text{COCOO}^- + \text{Enzima} \leftrightarrow \text{CH}_2\text{COCOO}^- + \text{HS-Enzima} \quad (1)$ $\text{HS-Enzima} + \text{CN}^- \leftrightarrow \text{Enzima} + \text{SCN}^- \quad (2)$	<i>E. coli</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Leishmania major</i> .
Vías de Síntesis	
β-Cianoalanina sintetasa $\text{L-Cisteína (o OAS)} + \text{CN}^- \leftrightarrow \beta\text{-cianoalanina} + \text{H}_2\text{S (o CH}_3\text{OO}^-)$	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
γ-Ciano-α-ácido aminobutírico sintetasa $\text{Homocistina} + 2\text{CN}^- \rightarrow \gamma\text{-Ciano-}\alpha\text{-ácido aminobutírico} + \text{SCN}^-$ $+ \text{Homocisteína}$	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i>

(Fuente: Tomado de Ebbs, 2004; Dzombak *et al.*, 2006 y Gupta *et al.*, 2010)

La disponibilidad del oxígeno es un factor importante en la mineralización del cianuro, ya que es consumido en varias vías degradativas del cianuro (O'Reilly y Turner, 2003).

Muchas investigaciones realizadas *in vitro* señalan que para mejorar el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio durante las pruebas de biodegradación del cianuro, los cultivos deben agitarse, por lo general, entre 120 a 250 rpm (White *et al.*, 1988; Dumestre *et al.*, 1997; Patil y Paknikar, 2000; Sorokin *et al.*, 2001; Grigor'eva *et al.*, 2006; Luque-Almagro *et al.*, 2005; Huertas *et al.*, 2010). No obstante, cabe señalar que el oxígeno no es absolutamente indispensable para la biodegradación del cianuro, ya que ésta también puede ocurrir bajo condiciones anaeróbicas (Fallon *et al.*, 1991; Gijzen *et al.*, 2000; Annachhatre y Amornkaew, 2000).

La temperatura es otro factor importante para la degradación del cianuro. Las enzimas responsables de la biodegradación/asimilación del cianuro son producidas generalmente por organismos mesofílicos, aislados frecuentemente del suelo, con temperaturas óptimas entre 20 y 40°C (Kao *et al.*, 2003; Cowan *et al.*, 1998; Akcil *et al.*, 2003; Dumestre *et al.*, 1997; Dursun y Aksu, 2000; Babu *et al.*, 1992).

El pH puede ser un factor importante en la biodegradación del cianuro. La mayoría de investigaciones señalan que la degradación microbiana del cianuro se produce a pH cercanos a la neutralidad. Sin embargo, la biodegradación del tiocianato y el cianuro, también se produce bajo condiciones alcalinas (pH>9) (Adjei y Ohta, 2000; Dumestre *et al.*, 1997; Sorokin *et al.*, 2001; Akcil *et al.*, 2003; Luque-Almagro *et al.*, 2005). Mientras que la degradación de los complejos cianuro-metal se da bajo condiciones ácidas (pH 4,0) (Barclay *et al.*, 1998).

Los microorganismos que degradan cianuro pueden emplear una variedad de fuentes de carbono, estos pueden ser azúcares simples como la glucosa (Adjei y Ohta, 2000), acetato (Sorokin *et al.*, 2001; Luque-Almagro *et al.*, 2005), melaza de caña (Patil y Paknikar, 2000), fenol (Fedorak y Hrudey 1989; Wong-Chong, 1989). Sin embargo, algunos microorganismos también pueden utilizar el cianuro, como única fuente de

carbono y nitrógeno (Chapatwala *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1991; Ezzi-Mufaddal y Lynch, 2002; Dzombak *et al.*, 2006; Parmar *et al.* 2012; Bhalla *et al.*, 2012). Los microorganismos también pueden utilizar el cianuro (cianuro libre, nitrilos, tiocianato, complejos cianuro-metal, etc.), como única fuente de nitrógeno (Knowles, 1976; Harris y Knowles, 1983; Ebbs, 2004; Chen y Kunz, 1997; Adjei y Ohta, 2000; Kwon *et al.*, 2002; Karavaiko *et al.*, 2000). Cuando el cianuro es empleado junto con otras fuentes de nitrógeno, la biodegradación puede inhibirse completamente (Dursun *et al.*, 1999).

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

En los relaves mineros cianurados existen bacterias alcalófilas capaces de tolerar y utilizar el cianuro como fuente de carbono y energía, generando su biodegradación.

3.2 Objetivos

3.2.1 General:

Evaluar a nivel de laboratorio la biodegradación del cianuro por bacterias alcalófilas aisladas de relaves mineros procedentes de la Planta Concentradora Mesapata – Cátac - Ancash.

3.2.2 Específicos:

- I. Aislar, seleccionar e identificar bacterias alcalófilas en muestras de relaves mineros procedentes de la Planta Concentradora Mesapata (Cátac, Ancash).
- II. Evaluar y determinar las condiciones óptimas para el desarrollo microbiano y la biodegradación de cianuro.
- III. Evaluar la cinética de crecimiento y biodegradación del cianuro.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Lugar de muestreo

Las muestras fueron colectadas de los relaves procedentes de la Planta Concentradora de Minerales Mesapata, ubicada en el distrito de Cátac, provincia de Recuay, departamento de Ancash; a unos 3 552 metros de altitud aproximadamente. Sus coordenadas son: Longitud Oeste: 77°25'38" a 77°25'39", Latitud Sur: 9°30'17" a 9°30'18" (Figura 3).



Figura 3. Planta Concentradora Mesapata Cátac – Ancash, 2013

(3 552 metros de altitud)

4.2 Recolección de muestras

Se determinaron 7 puntos de muestreo en base al tamaño y la accesibilidad al pozo de relaves (Figura 4). Las muestras líquidas fueron colectadas en frascos de plástico de primer uso, con capacidad de 1 litro. Se colectaron aproximadamente 500 mL de muestra por cada punto. En el caso de muestras de sólidas (tierra y/o lodo), se tomaron aproximadamente 500 g de muestra y se colocaron en frascos de plástico. Para cada punto de muestreo se determinó el pH de la muestra. Las muestras fueron

preservadas a una temperatura $<10^{\circ}\text{C}$ y transportadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.



Figura 4. Puntos de muestreo en el pozo de relaves de la Planta Concentradora Mesapata, Cátac – Ancash, 2013.

4.3 Enriquecimiento selectivo de bacterias degradadoras de cianuro

Para la selección de bacterias alcalófilas se siguió la metodología propuesta por Rainey y Oren (2006). De cada muestra líquida se tomó 10 mL y se adicionó en 100 mL de un Medio Mineral tamponado con buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M a pH 9,5 (ver Anexos). Los cultivos fueron incubados a temperatura de laboratorio ($20 - 25^{\circ}\text{C}$) por 3 días. Se tomaron 10 mL de cada cultivo y se inocularon en 90 mL del Medio Mineral suplementado con 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L de CN^- . Los cultivos se incubaron en agitación a 180 rpm durante 3 días a temperatura ambiente.

En el caso de muestras de sólidas, se tomaron 100 g de muestra y se colocaron en frascos de plástico que contenían 200 mL de solución salina estéril a pH 9,5. Los frascos fueron agitados por unos minutos para luego dejarlos reposar por 1 hora. Finalmente, se tomaron 200 mL de la suspensión y se repitió el procedimiento empleado para las muestras líquidas. Se seleccionaron los cultivos que presentaron

crecimiento microbiano en menor tiempo, evidenciado por el desarrollo de turbidez en el medio.

4.4 Aislamiento e identificación de bacterias alcalófilas degradadoras de cianuro

Para el aislamiento bacteriano, a partir de los cultivos seleccionados, se realizaron diluciones seriadas sobre el medio mineral. De cada dilución se tomó una alícuota de 0,1 mL y se sembró por duplicado mediante el método de diseminación en placa sobre los siguientes medios cultivo: Agar nutritivo, Agar King-B y Agar cianuro (ver Anexos). Todos los medios fueron ajustados a pH 9,5. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días.

Para la identificación bacteriana presuntiva se realizó el reconocimiento de colonias en los medios de cultivo, morfología microscópica y la prueba de la oxidasa. La identificación final se realizó únicamente sobre las cepas que mostraron un buen rendimiento en el ensayo de biodegradación. Para ello, se empleó el sistema comercial automatizado API 20NE (bioMérieux®) y otras pruebas complementarias.

4.5 Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos

Para la realización de esta prueba siguió la metodología propuesta por Tiago *et al.*, 2004. Para ello, se empleó un cultivo de 24 horas y un caldo nutritivo conteniendo la décima parte de cada uno de sus componentes, esto con el propósito de recrear las condiciones oligotróficas del suelo. Para la evaluar la tolerancia a niveles altos de pH, se inoculó 0,1 mL de cada cultivo en 10 mL de caldo nutritivo ajustado con HCl 1N y NaOH 1N a los siguientes valores de pH: 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5 y 12,0. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 3 días. Se determinó el nivel óptimo de pH en función al crecimiento microbiano, evidenciado por la turbidez en los

tubos de prueba. Para ello se empleó el criterio: Sin crecimiento (-), Poco crecimiento: (+), Crecimiento moderado: (++) y Crecimiento abundante: (+++), el cual corresponde aproximadamente a 0; 0,5; 1 y 2 de la Escala de McFarland, respectivamente.

4.6 Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

Para determinar la tolerancia y concentración óptima de cianuro se empleó la metodología descrita en la prueba anterior (4.5), se inóculo 0,1 mL de cada cultivo 10 mL de un caldo nutritivo conteniendo concentraciones de 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L de CN^- . Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 3 días. Se determinó la concentración óptima de cianuro en función al tiempo de incubación y el crecimiento microbiano, evidenciado por la turbidez en los tubos de prueba. Para ello se empleó criterio descrito en la prueba anterior (4.5).

4.7 Evaluación de la cinética de crecimiento y degradación del cianuro

Para esta evaluación se preparó, de cada cepa seleccionada en el ensayo anterior, un cultivo de 24 horas en 50 mL de caldo nutritivo (conteniendo la décima parte de sus componentes) ajustado a un pH 9,5. Los cultivos fueron centrifugados a 3 500 rpm por 15 minutos y el *pellet* resultante se resuspendió con 10 mL de solución salina estéril ajustado a pH 9,5; este proceso se repitió 3 veces, para garantizar que la única fuente de carbono y nitrógeno disponible sea el cianuro. Finalmente se tomó 40 mL de la última suspensión y se inoculó en 400 mL del Medio Mineral. Los parámetros óptimos de pH y concentración de CN^- para el ensayo de biodegradación, fueron determinados anteriormente en los ensayos 4.5 y 4.6. Los cultivos se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente y en agitación a 180 rpm. Cada 24 horas se tomaron muestras de 12 mL para monitorear el crecimiento bacteriano y la cinética de biodegradación del cianuro.

Los parámetros cinéticos de crecimiento y biodegradación se evaluaron mediante el cálculo de la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}), Ecuación 1; el tiempo de duplicación celular T_d (h), Ecuación 2; y la tasa constante de biodegradación k (h^{-1}), Ecuación 3. La eficiencia del ensayo de biodegradación fue determinada mediante el cálculo de la tasa de biodegradación r ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), Ecuación 4; y el porcentaje de biodegradación Ecuación 5:

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_o}{t} \quad [1]$$

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [2]$$

$$k = \frac{\ln C_o - \ln C_f}{t} \quad [3]$$

$$r = \frac{C_o - C_f}{t_f - t_o} \quad [4]$$

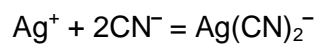
$$\% \text{Biodegradación} = \frac{S_o - S_f}{S_o} \times 100 \quad [5]$$

donde X_o y X_f es el número de células (UFC/mL) inicial y final de la fase exponencial de crecimiento, tomadas en los tiempos t_o y t_f ; C_o y C_f es la concentración de cianuro (mg/L) inicial y final de la fase exponencial de biodegradación. S_o y S_f es la concentración de cianuro (mg/L) inicial y final del ensayo.

4.8 Determinación del cianuro por volumetría

La cuantificación del cianuro se realizó mediante un análisis volumétrico, siguiendo la metodología descrita por Nava *et al.*, 2007 (ver Anexos). La técnica se basa en la

reacción del nitrato de plata (AgNO_3) con el ión cianuro en solución alcalina ($\text{pH} \geq 11$) para formar el complejo soluble $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ según la reacción:



Cuando no queda más cianuro en solución, el exceso de plata precipita como AgCN o reacciona con el indicador yoduro de potasio (KI) para formar AgI . En ambos casos, el punto final de la titulación lo proporciona la aparición de una turbidez permanente, blanca o amarillo opalescente. El análisis volumétrico del CN^- se realizó por duplicado.

V. RESULTADOS

5.1 Selección e identificación de bacterias alcalófilas potencialmente degradadoras de cianuro

Se colectaron en total 7 muestras de relave, 4 muestras de sedimento y 3 muestras líquidas, a partir de los puntos señalados en la Figura 4. Las muestras presentaron valores de pH entre 10,1 y 11,7; siendo los más altos el de las muestras líquidas (ver Tabla 6).

Tabla 6. Puntos de muestreo e identificación presuntiva de las cepas aisladas.

Punto de muestreo	pH de la muestra	Tipo de muestra	Cepas seleccionadas	Coloración Gram	Oxidasa
1	10.3	Sedimento	P-CIAN 1	Bacilos Gram +	-
			P-NUT 7	Bacilos Gram -	+
			P-NUT 3	Bacilos Gram -	+
			P-NUT 6	Bacilos Gram -	-
2	10.1	Sedimento	P-KING 6	Bacilos Gram -	+
			P-KING 3	Bacilos Gram -	+
			P-KING 9	Bacilos Gram -	+
			P-NUT 8	Bacilos Gram -	+
3	10.6	Sedimento	P-KING 1	Bacilos Gram +	-
			P-NUT 2	Bacilos Gram -	+
			P-KING 11	Bacilos Gram -	-
			P-KING 4	Bacilos Gram -	+
4	10.9	Sedimento	P-NUT 5	Bacilos Gram -	-
			P-KING 7	Bacilos Gram	+
			P-KING 10	Bacilos Gram -	+
5	11.4	Líquida	P-KING 2	Bacilos Gram -	+
			P-CIAN 2	Bacilos Gram -	+
			P-KING 8	Bacilos Gram -	+
6	11.7	Líquida	P-NUT 9	Bacilos Gram -	+
			P-CIAN 3	Bacilos Gram -	+
			P-KING 12	Bacilos Gram +	-
7	11.6	Líquida	P-NUT 1	Bacilos Gram -	+
			P-NUT 6	Bacilos Gram +	-
			P-KING 5	Bacilos Gram +	-

Los cultivos provenientes de los puntos de muestreo 5, 6 y 7 obtuvieron los mejores resultados, observándose crecimiento microbiano a las 48 horas de incubación en concentraciones de hasta 200 mg/L de CN^- . En los demás cultivos se observó crecimiento después de 72 horas de incubación en concentraciones de hasta 50 mg/L de CN^- .

En total, se lograron seleccionar en total 24 cepas alcalófilas potencialmente degradadoras de cianuro. Las cepas aisladas fueron identificadas preliminarmente y solo las cepas provenientes de los puntos de muestreo 5, 6 y 7 fueron seleccionadas para determinar sus condiciones óptimas de crecimiento y biodegradación, por mostrar un mejor desempeño en la prueba de selección preliminar.

5.2 Evaluación de las condiciones óptimas de pH y concentración de cianuro

Todas las cepas seleccionadas mostraron crecimiento rápido o moderado frente a una concentración de 25 mg/L de CN^- a las 24 horas de incubación. En los cultivos con 50 mg/L de CN^- se observaron resultados más variables hasta las 72 horas de incubación. Solo las cepas P-CIAN 2, P-NUT 1 y P-KING 2 mostraron crecimiento rápido o moderado frente a una concentración de 100 mg/L de CN^- a las 24 horas de incubación. La cepa P-KING 2 mostró un crecimiento moderado frente a una concentración de 200 mg/L de CN^- hasta las 72 horas de incubación (ver Tabla 7).

Tabla 7. Tolerancia de bacterias alcalófilas a diferentes concentraciones de cianuro.

CEPAS	CN ⁻ (mg/L)					
	25	50	100	200	400	500
P-CIAN 1	+++	+++	+	-	-	-
P-NUT 7	+++	++	-	-	-	-
P-NUT 3	++	++	+	-	-	-
P-NUT 6	+++	++	++	-	-	-
P-KING 6	++	++	+	-	-	-
P-KING 3	+++	++	+	-	-	-
P-KING 9	++	+	+	-	-	-
P-NUT 8	++	++	-	-	-	-
P-KING 1	++	+	-	-	-	-
P-NUT 2	+++	++	++	-	-	-
P-KING 11	++	+	-	-	-	-
P-KING 4	++	++	-	-	-	-
P-NUT 5	++	+	+	-	-	-
P-KING 7	++	+	-	-	-	-
P-KING 10	++	++	+	-	-	-
P-KING 2	+++	+++	+++	++	-	-
P-CIAN 2	+++	+++	++	+	-	-
P-KING 8	+++	++	++	-	-	-
P-NUT 9	+++	++	++	-	-	-
P-CIAN 3	+++	++	++	-	-	-
P-KING 12	+++	++	++	-	-	-
P-NUT 1	+++	+++	+++	+	-	-
P-NUT 6	++	++	++	-	-	-
P-KING 5	+++	++	+	-	-	-

- : Sin crecimiento, +: Crecimiento lento, ++: Crecimiento moderado, +++: Crecimiento rápido

La evaluación de las condiciones óptimas de pH mostraron que, a valores de pH 11 todas las cepas seleccionadas tuvieron un crecimiento rápido a moderado hasta las 48 horas de incubación. Las cepas P-KING 2, P-CIAN 2 y P-NUT 1 mostraron un crecimiento rápido a pH 11,5 a las 48 horas de incubación. Solo P-KING 2 mostró un crecimiento moderado hasta las 72 horas de incubación (Tabla 8).

Tabla 8. Tolerancia de bacterias alcalófilas a diferentes valores de pH.

CEPAS	pH					
	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0
P-CIAN 1	+++	+++	+++	++	++	-
P-NUT 7	+++	+++	++	++	+	+
P-NUT 3	+++	+++	+++	+	++	+
P-NUT 6	+++	++	++	++	+	+
P-KING 6	+++	++	++	+	+	-
P-KING 3	+++	+++	+++	++	++	+
P-KING 9	+++	+++	+++	++	++	+
P-NUT 8	+++	+++	+++	++	+	-
P-KING 1	+++	++	++	++	+	-
P-NUT 2	+++	+++	+++	+++	++	+
P-KING 11	+++	+++	++	+	++	+
P-KING 4	+++	+++	+++	++	+	-
P-NUT 5	+++	+++	+++	++	++	+
P-KING 7	+++	++	++	++	+	-
P-KING 10	+++	+++	+++	+++	++	-
P-KING 2	+++	+++	+++	+++	++	+
P-CIAN 2	+++	+++	+++	+++	++	+
P-KING 8	+++	+++	+++	+++	++	+
P-NUT 9	+++	+++	+++	+++	++	+
P-CIAN 3	+++	+++	+++	+++	++	+
P-KING 12	+++	+++	++	++	+	-
P-NUT 1	+++	+++	+++	+++	++	+
P-NUT 6	+++	+++	+++	++	++	+
P-KING 5	+++	+++	++	++	++	-

- : Sin crecimiento, +: Crecimiento lento, ++: Crecimiento moderado, +++: Crecimiento rápido

5.3 Cinética de crecimiento y degradación del cianuro

Las cepas empleadas para esta prueba provinieron de los puntos 5, 6 y 7 del pozo de relaves. Los parámetros determinados para esta evaluación fueron pH 11,0 y 100 mg/L de CN^- . Los inóculos iniciales para la prueba de biodegradación se encontraban entre 10^5 y 10^6 UFC/mL. Los resultados de esta evaluación se detallan en las Figuras 5 al 7. Al final de la evaluación se observó una reducción de 2 mg/L de CN^- en el cultivo control (Figura 8), y la formación de precipitados blancos en algunos cultivos.

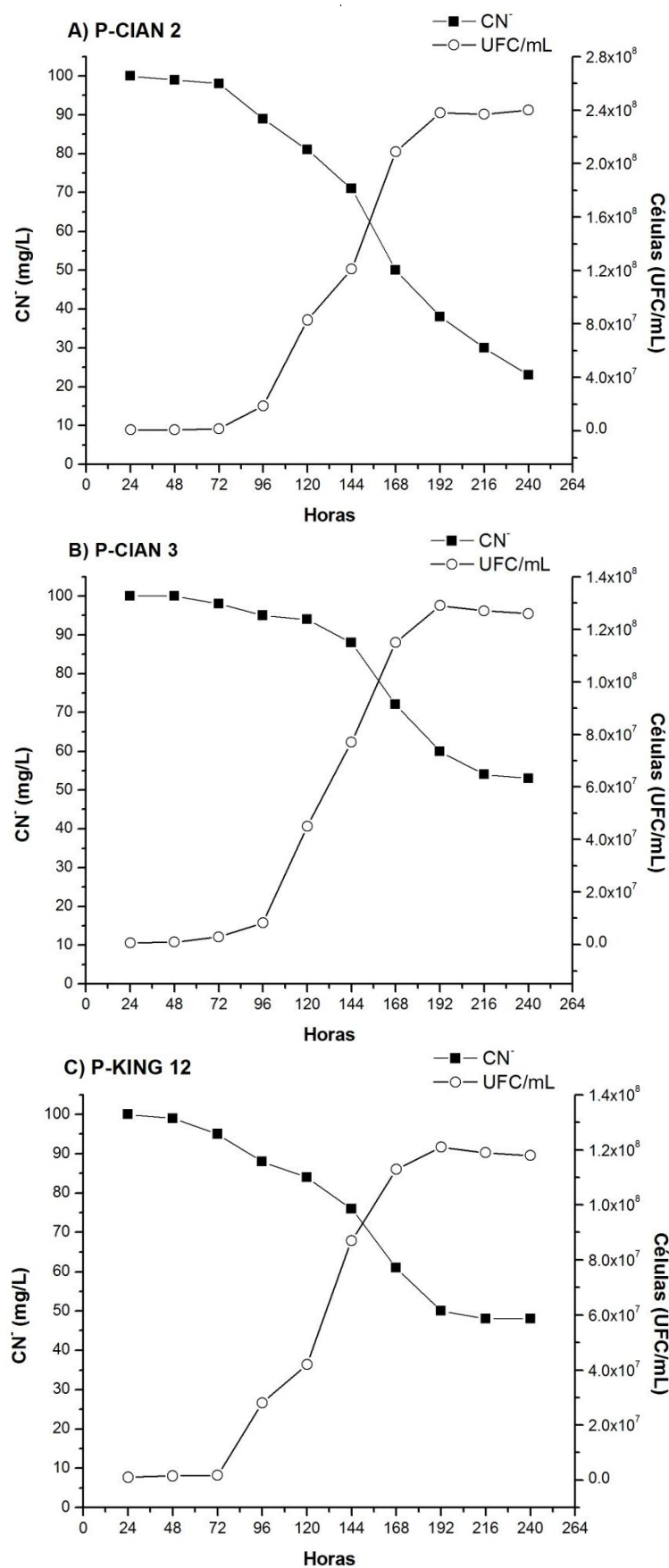


Figura 5. Crecimiento microbiano y degradación del cianuro por las cepas: A) P-CIAN 2, B) P-CIAN 2 y P-KING 12.

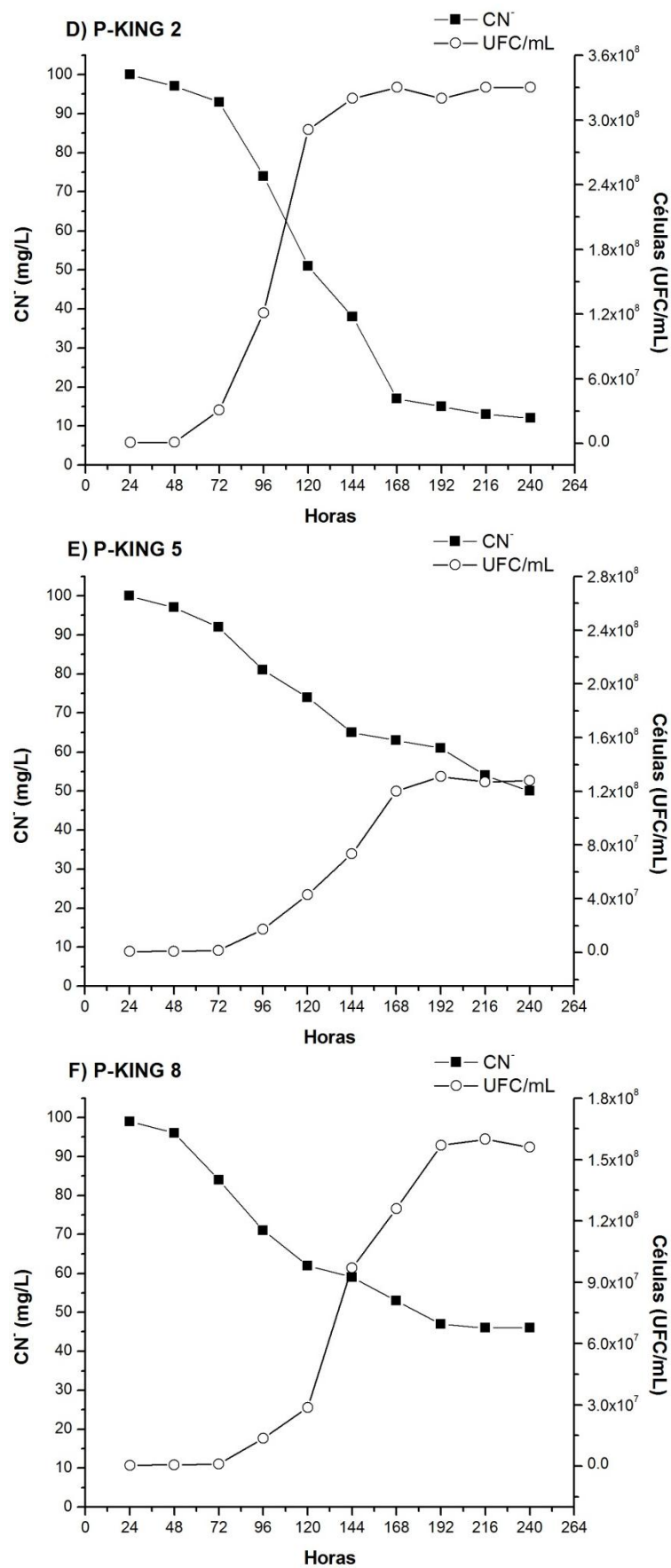


Figura 6. Crecimiento microbiano y degradación del cianuro por las cepas: D) P-KING 2, E) P-KING 5 y F) P-KING 8.

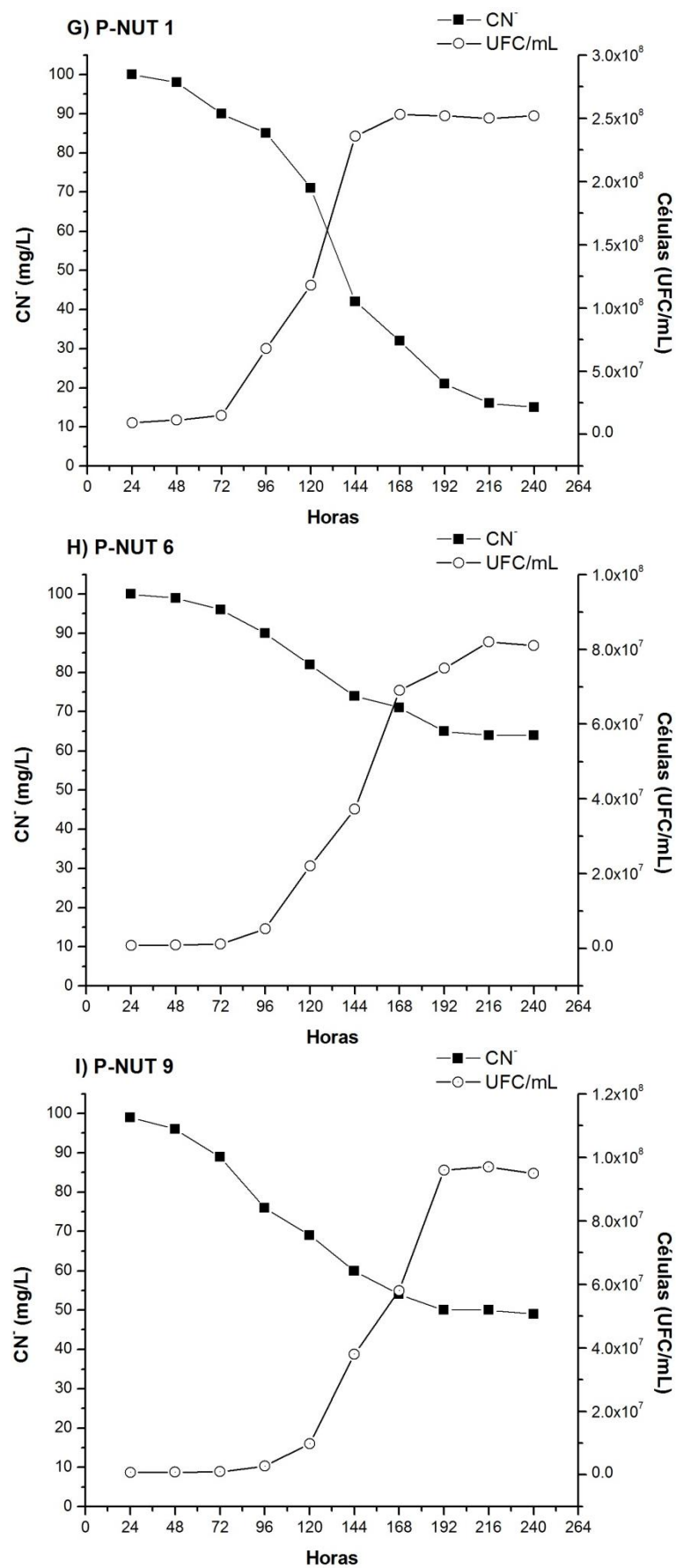


Figura 7. Crecimiento microbiano y degradación del cianuro por las cepas: G) P-NUT 1, H) P-NUT 6 y I) P-NUT 9.

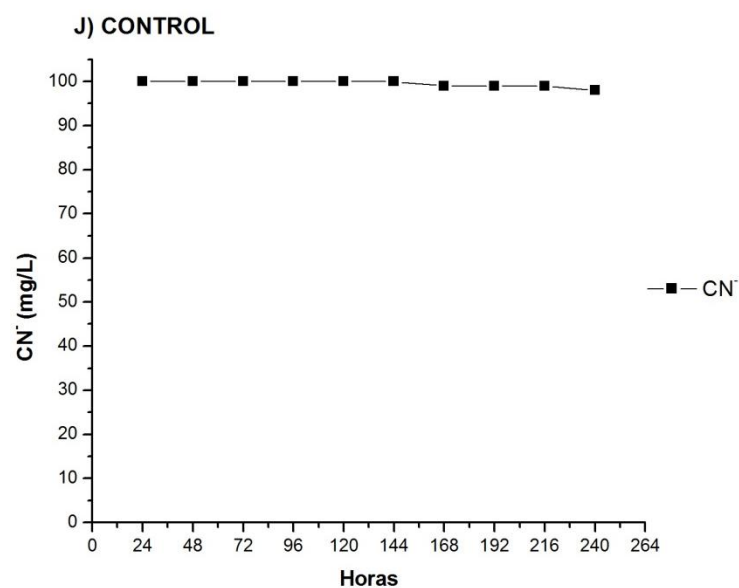


Figura 8. Control de la biodegradación del cianuro en un cultivo sin inocular.

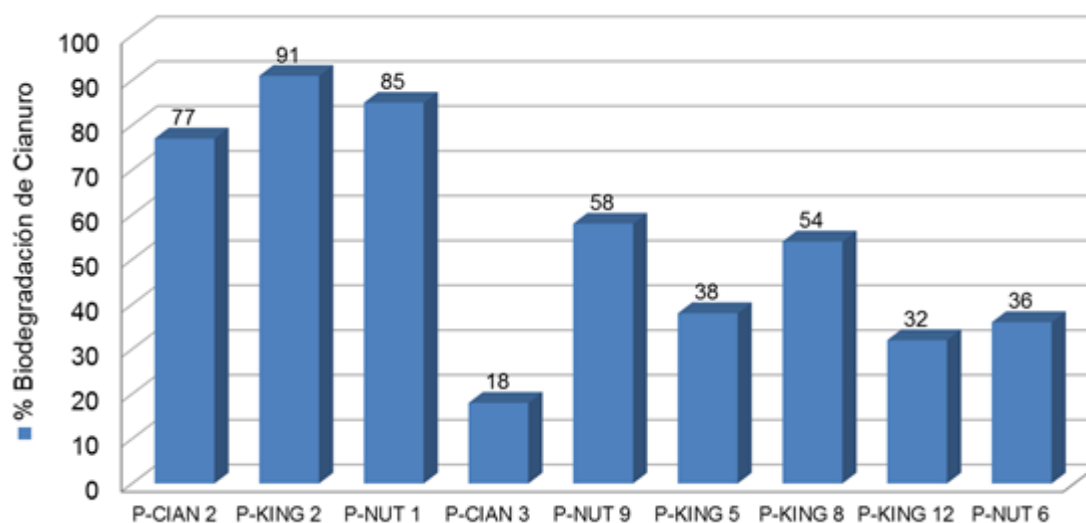


Figura 9. Porcentaje de biodegradación del cianuro por las cepas evaluadas.

En comparación con las demás cepas, los aislados P-KING 2, P-NUT 1 y P-CIAN 2 mostraron un mejor rendimiento durante la prueba de biodegradación, llegando a remover hasta 91, 85 y 77% de CN^- , respectivamente (Figura 9). Los parámetros cinéticos de las cepas P-CIAN 2, P-KING 2 y P-NUT 1, se determinaron graficando y linealizando los datos de las curvas de crecimiento y biodegradación (Figura 10). Los resultados de los parámetros cinéticos se resumen en la Tabla 9.

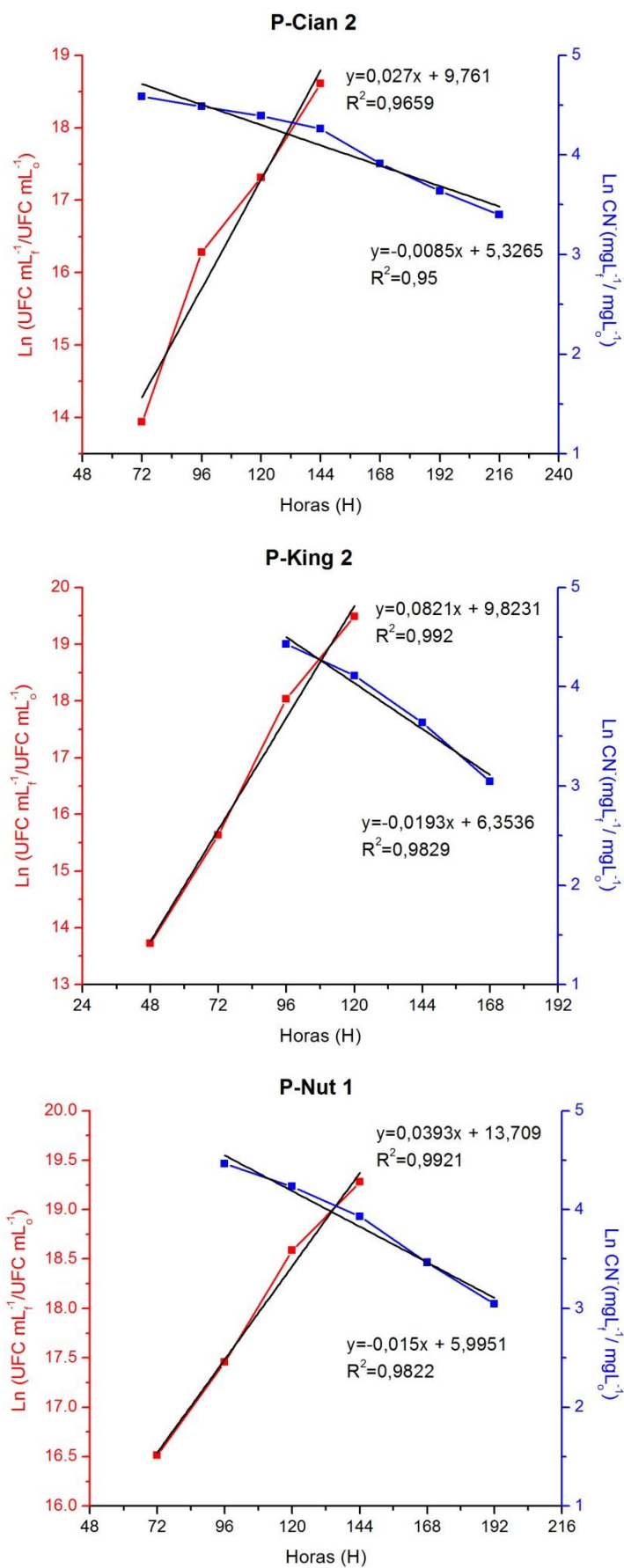


Figura 10. Relación entre el crecimiento y biodegradación del cianuro.

Tabla 9. Resumen de resultados de los parámetros cinéticos.

Parámetros	Unidad	P-CIAN 2	P-KING 2	P-NUT 1
μ	(h ⁻¹)	0,063	0,082	0,039
T_d	(h)	11,055	8,443	17,637
- k	(h ⁻¹)	0,009	0,019	0,015
r	(mg L ⁻¹ h ⁻¹)	0,472	0,875	0,688
Biodegradación	%	77	91	85

La identificación bacteriana final se realizó sobre las cepas P-CIAN 2, P-KING 2 y P-NUT 1. Los resultados de la base de datos API 20 NE y las pruebas complementarias (crecimiento en Tween 80 y a 42°C), identificaron a la cepa P-KING 2 y P-NUT 1 como *Chromobacterium violaceum* (con un 99,9% de confianza) y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, respectivamente. La cepa P-CIAN 2 mostro un perfil inaceptable y no puso ser identificada (ver Anexos).

VI. DISCUSIÓN

6.1 Selección, aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de cianuro

Las cepas P-King 2, P-Cian 2 y P-Nut 1, seleccionadas de los cultivos provenientes de muestras líquidas, presentaron los mejores rendimientos. Esto probablemente se debe a que los microorganismos presentes en las muestras líquidas se encuentran más expuestos y metabólicamente más adaptados al cianuro que en muestras de tierra y/o lodo; donde rara vez se puede encontrar al cianuro biológicamente disponible, ya que puede estar formando complejos muy estables con trazas de metales, microbiológicamente metabolizado o volatilizado (Towill *et al.*, 1978; Bhalla *et al.*, 2012).

A diferencia de White *et al.* (1988), quienes empleando un medio sólido similar (0,05% de cianuro y 0,005% de extracto de levadura), no lograron obtener colonias en este medio; las cepas P-CIAN 1, P-CIAN 2 y P-CIAN fueron capaces de crecer sobre Agar cianuro después de 5 días de incubación. Esto no significa que las cepas aisladas en los medios Agar nutritivo y King B sean incapaces de utilizar el cianuro como fuente energética. White *et al.* (1988), explica que esto podría deberse a que algunos ingredientes del medio de cultivo pueden reaccionar con el cianuro y reducir su disponibilidad.

Por otro lado, Babu *et al.* (1992) empleando un medio mínimo mineral suplementado solo con 100 mg/L de CN^- como única fuente carbono y nitrógeno, también lograron aislar una cepa capaz de degradar el cianuro (*Pseudomonas putida*) después de 7 días de incubación a 25 °C. Al parecer el uso de metales traza en los cultivos sólidos, permite una mejor recuperación de microorganismos que utilizan cianuro como fuente energética.

Las cepas P-KING 2 (*Chromobacterium violaceum*) y P-NUT 1 (*P. pseudoalcaligenes*) fueron capaces de biodegradar el cianuro utilizándolo como única fuente de carbono y nitrógeno. *C. violaceum* es una bacteria cianogénica capaz de utilizar el cianuro tanto por vía degradativa como asimilativa. Esta bacteria convierte el cianuro en β -cianoalanina (un nitrilo), la cual puede ser utilizada como fuente de carbono y nitrógeno por acción de la nitrilo hidratasa (Knowls, 1976; O'Reilly & Turner, 2003, Gupta *et al.* 2010). Luque-Almagro *et al.* (2005) reportaron la capacidad de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 para utilizar el cianuro solo como fuente de nitrógeno. La asimilación del cianuro por esta bacteria implica la formación de una cianhidrina la cual, como todo nitrilo, pudiera ser utilizada como fuente de carbono y nitrógeno, como ocurre en otros microorganismos (Luque-Almagro, 2006; DiGeronimo y Antonie, 1976; Asano *et al.* 1982; Nawaz *et al.* 1989; Chapatwala *et al.* 1990; Kobayashi *et al.* 1994; Chapatwala *et al.*, 1995; Sorokin *et al.* 2007). Por otro parte, la presencia de una nitrilo hidratasa en *P. pseudoalcaligenes* sugiere que esta cepa pudiera utilizar el cianuro como fuente de carbono y nitrógeno (Luque-Almagro, 2006; Gupta *et al.* 2010).

6.2 Evaluación de las condiciones óptimas de pH y concentración de cianuro

Los mecanismos de biodegradación del cianuro en los microorganismos están basados en la tolerancia al cianuro. Cuando la concentración de cianuro se incrementa la fase latencia puede extenderse y disminuir la tasa de biodegradación o en última instancia inhibir completamente el crecimiento celular. Los resultados de este trabajo mostraron que una concentración de 100 mg/L de CN^- es óptima para las cepas P-KING 2, P-NUT 1 y P-CIAN 2. A pesar que la cepa P-KING 2 mostró un crecimiento moderado en 200 mg/L de CN^- , tardó 48 horas más de incubación.

Todas las cepas seleccionadas mostraron un crecimiento rápido o moderado hasta niveles de pH 11,0. Solo 6 cepas, provenientes de los puntos de muestreo 5 al 7,

tuvieron un crecimiento moderado a pH 11,5 y 12,0 (Tabla 8). Los altos niveles de tolerancia de estas cepas a condiciones alcalinas pueden explicarse a los elevados valores pH de las muestras (pH 10,1 a 11,7). Los efluentes cianurados frescos presentan pH entre 10 y 12 (Bowell *et al.*, 1999; Oudjehani *et al.* 2002); por tal motivo, la constante exposición de los microorganismos a esos niveles de pH selecciona solo a aquellos capaces de adaptarse a estas condiciones alcalinas.

La mayoría de trabajos sobre biodegradación del cianuro se han realizado en cultivos con pH cercanos a la neutralidad y empleando glucosa como fuentes de carbono. No obstante, estas condiciones pueden sobrevalorar el rendimiento del proceso biodegradativo. En soluciones con pH < 9,2 el cianuro tiende a volatilizarse y perderse en forma de HCN gaseoso (Dzombak *et al.* 2006). Aunque el HCN puede ser asimilado y degradado por algunos microorganismos, resulta difícil establecer si la degradación ocurre por acción microbiana o por volatilización (Luque-Almagro, 2006). En trabajos como los de Meyers *et al.* (1991), Dumestre *et al.* (1997), Akcil *et al.* (2003), Luque-Almagro *et al.* (2005) y el presente, se emplean microorganismos capaces de degradar el cianuro bajo condiciones alcalinas (pH>9,2). La ventaja de usar microorganismos alcalófilos en procesos de biodegradación del cianuro es que los efluentes no requieren de un tratamiento previo para reducir sus valores de pH a niveles óptimos por microorganismos neutrófilos, y se evita la emisión de HCN al ambiente. En cuanto a la utilización de glucosa, según la reacción de Killiani todo azúcar reductor (p. ej. glucosa, fructosa, lactosa y maltosa) puede producir amonio en presencia de cianuro. Por lo tanto, en presencia de glucosa, la degradación de cianuro es un proceso químico independiente de la presencia del organismo en estudio (Luque-Almagro, 2006. B; Dumestre *et al.* 1997). Por esta razón, los estudios sobre degradación microbiana del cianuro deben evitar condiciones de neutralidad y el uso de azúcares reductores como fuentes de carbono (Karavaiko *et al.* 2000).

6.3 Evaluación de la cinética de crecimiento y degradación del cianuro

El volumen y concentración inicial del inóculo también ejercen un efecto importante en la eficiencia de la biodegradación microbiana (Patil y Paknikar, 2000). En este estudio los inóculo empleados (10% del volumen total y $10^5 - 10^7$ UFC/mL), fueron suficientes para alcanzar buenos porcentajes de degradación (hasta 91% en caso de la cepa P-KING 2). Akcil *et al.* (2003) y Huertas *et al.* (2010), empleando inóculos parecidos, 10% del volumen y $10^6 - 10^9$ UFC/mL, lograron rendimientos del 99%.

Las gráficas de cinética de crecimiento y biodegradación mostraron que la fase de latencia varió desde 48 hasta 96 horas para todas las cepas, solo la cepa P-KING 2 mostró el menor tiempo. La fase depende en gran medida del volumen y la edad del inóculo, la temperatura de incubación, el nivel de aireación, la composición y concentración de los nutrientes. Muchos trabajos registran tiempos de latencia que van desde pocas horas hasta varios días, esto puede deberse al grado de adaptación de las cepas a la concentración inicial de cianuro en el medio y a la necesidad de formar metabolitos intermediarios que faciliten la asimilación del cianuro (Meyers *et al.* 1991; Dumestre *et al.* 1997, Luque-Almagro *et al.* 2005b). En este trabajo, se controlaron varios de estos parámetros, excepto la temperatura de incubación durante el ensayo de biodegradación, pudiendo esto influenciar en el crecimiento celular y la eficiencia de la biodegradación.

Durante la fase exponencial, la velocidad de crecimiento de la cepa P-KING 2 ($0,082 \text{ h}^{-1}$) y el tiempo de duplicación (8,443 horas) fue superior al de las cepas P-CIAN 2 y P-NUT 1 (Tabla 9). Estos resultados son mejores que los reportados por Huertas *et al.* (2010), quienes determinaron para *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 una velocidad de crecimiento de $0,074 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 9.4 horas. Diversos trabajos establecen que la biodegradación del cianuro sigue un modelo cinético de primer

orden (Dursun *et al.* 1999; Oudjehani *et al.* 2002, Bhalla *et al.* 2012. Patil, 2013). En este sentido, la cepa P-KING 2 ($0,019 \text{ h}^{-1}$) mostró una constante superior que las cepas P-CIAN 2 y P-NUT 1 ($0,009 \text{ h}^{-1}$ y $0,015 \text{ h}^{-1}$). Por otro lado, Oudjehani *et al.* (2002), empleando una población microbiana nativa, determinaron una constante de biodegradación de $0,010 \text{ h}^{-1}$; mientras que Dumestre *et al.* (1997) reportaron una constante de $0,0017 \text{ h}^{-1}$ para *Fusarium solani* (IHEM 8026).

La mayor tasa de biodegradación se encontró en la cepa P-KING 2 ($0,875 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mientras que en P-CIAN 2 y P-NUT 1 las tasas fueron $0,472$ y $0,688$, respectivamente. Estas tasas de biodegradación son comparables con la de otros estudios también llevados a cabo en condiciones alcalinas. Akcil *et al.* (2003), reportó que *Pseudomonas sp.* es capaz de biodegradar el CN a una tasa de $1,98 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Huertas *et al.* (2010), encontró una tasa de $0,64 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. *Fusarium solani* (IHEM 8026) pudo hacerlo a $0,52 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Dumestre *et al.* 1997). El alga *Scenedesmus obliquus* degrada el CN a una tasa de $0,10 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Gurbuz *et al.* 2009). Las otras 6 cepas aisladas, no mostraron mucha capacidad de biodegradar el cianuro. Esto puede deberse a muchos factores, la concentración de cianuro empleada en el experimento resulta ser inhibitoria para estas cepas, la necesidad de formar consorcios para lograr una mejor asimilación o de incorporar, además del cianuro, otras fuentes de carbono o nitrógeno (Patil y Paknikar 2000).

Los mayores niveles de biodegradación en las cepas P-CIAN 2 y P-NUT 1 se producen principalmente durante la fase exponencial. Resultados similares también se observan en los trabajos de Meyers *et al.* (1991) y Luque-Almagro *et al.* (2005). Sin embargo, en la cepa P-KING 2 la máxima remoción del cianuro se produce marcadamente en el intervalo de la fase exponencial y la fase estacionaria (Figura 6). Esto se puede deber a que, durante ese intervalo, se produce la formación de β -cianoalanina (Rodgers y Knowls, 1982).

Por último, en comparación con otros trabajos llevados a cabo bajo condiciones alcalinas, las cepas P-KING 2, P-NUT 1 y P-CIAN 2 alcanzaron rendimientos cercanos al 100 % de degradación; siendo superior, en algunos casos, a los reportados en otros estudios. La temperatura de incubación puede haber restado eficacia al proceso biodegradativo, así como la formación de complejos cianurometálicos, evidenciados como precipitados en los cultivos, los cuales pueden haber disminuido la biodisponibilidad al cianuro.

VII. CONCLUSIONES

1. Se logró aislar 24 cepas de bacterias alcalófilas procedentes de los relaves de la Planta Concentradora Mesapata, con excelente o buena capacidad de degradar cianuro.
2. Las cepas P-CIAN 2, *Chromobacterium violaceum* P-KING 2 y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* P-NUT 1 fueron capaces de tolerar niveles pH de 11,5 y 100 mg/L de cianuro.
3. La cepa *Chromobacterium violaceum* P-KING 2 presentó el mejor rendimiento cinético de biodegradación de cianuro, seguida por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* P-NUT 1 y la cepa P-CIAN 2.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Determinar los productos finales de la biodegradación del cianuro para conocer las posibles rutas metabólicas y enzimas implicadas en este proceso, con el fin de crear mejores condiciones y acelerar el proceso degradación del cianuro.
2. Completar la identificación de la cepa P-CIAN 2 y evaluar los niveles de biodegradación de cianuro de las cepas P-KING 2, P-CIAN 2 y P-NUT 1 como consorcio microbiano.
3. Realizar pruebas de biodegradación *in-situ* para determinar los niveles reales de remoción del cianuro y compuestos derivados de los relaves recolectados de la Planta Concentradora Mesapata.
4. Evaluar la capacidad de cianogénica de la cepa P-KING 2 y su potencial uso en procesos de recuperación del oro.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

ADJEI, M. D. & OHTA, Y. Factors affecting the biodegradation of cyanide by *Burkholderia cepacia* strain C-3. *J. Biosci. Bioengineer.* 2000, vol. 89, p. 274–277.

AKCIL, A. Destruction of cyanide in gold mill effluents: Biological versus chemical treatments. *Biotechnol. Adv.* 2003, vol. 21, p. 501–510.

AKCIL, A.; KARAHAN A. G.; CIFTCI, H. & SACDIG, O. Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas sp.*). *Minerals Engineering.* 2003, col. 16, p. 643–649.

ÁLVAREZ, G. R. “Aplicación de sistemas pasivos para el tratamiento de soluciones residuales de procesos de cianuración en minería de oro”. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas de Oviedo, Oviedo, 2005.

ANNACHHATRE, A. P. & AMORNKAEW, A. Toxicity and degradation of cyanide in batch methanogenesis. *Environ. Technol.* 2000, vol. 21, p. 135.

ASANO, Y.; FUJISHIRO, K.; TANY, Y. & YAMADA, H. Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter sp.* J-1: purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 1982, vol. 46, p. 1165–1174.

ASKELAND, R. A. & MORRISON S. M. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, vol. 45, p. 1802–1807.

BABU, G. R. V.; WOLFRAM J. H., & CHAPATWALA K. D. Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology*. 1992, vol. 9, p. 235–238.

BARCLAY, M.; HART, A.; KNOWLES, C.J.; MEEUSSEN, J. C. & TETT, V. A. Biodegradation of Metal Cyanide by Mixed and Pure Cultures of Fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, vol. 22, p. 223–231.

BAXTER, J. & CUMMINGS, S. P. The Current and Future Applications of Microorganism in the Bioremediation of Cyanide Contamination. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006, vol. 90, p. 1–17

BHALLA, T. C.; SHARMA, N. & BHATIA R. *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*. Chap. 25: Microbial degradation of cyanides and nitriles, 1 s. t. Edition. Ed. T. Satyanarayan *et al.* 2012, p. 569–587.

BOTZ, M.; MUDDER, T. & AKCIL, A. *Advances in Gold Ore Processing*. Chap. 28: Cyanide treatment: physical, chemical and biological processes. Ed. M. Adams, Elsevier Ltd., Amsterdam, 2005, p. 672–702.

BOWELL, R. J.; CONNELLY, R. J.; DODDS, J. E.; SADLER, P. J. K. & WILLIAMS, K. *Chemical containment of mining waste*. In: *Chemical Containment of Waste in the Geosphere*, Eds. Metcalfe, R. & Rochelle, C. 1999, vol. 157, p. 213-240

CHAPATWALA, K. D.; BABU, G. R. V.; VIJAYA, O. K.; KUMAR K. P. & WOLFRAM, J. H. Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1998, vol. 20, p. 28–33.

CHAPATWALA, K. D.; BABU, G. R. V.; ARMSTEAD, E. R.; WHITE, E. M.; & WOLFRAM, J. H. A kinetic study on the bioremediation of sodium cyanide and acetonitrile by free and immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995, vol. 51-52, p. 717–726.

CHAPATWALA, K. D.; NAWAZ, M. S.; RICHARDSON, J. D. & WOLFRAM, J. H. Isolation and characterization of acetonitrile-utilizing bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 1990, vol. 5, p. 65–69.

CHEN, J. L. & KUNZ, D. A. Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore, *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, vol. 156, p. 61.

COWAN, D.; CRAMP, R. A.; PERIERA R.; GRAHAM, D. & ALMATAWAH, Q. Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes. *Extremophiles.* 1998, vol. 2, p. 207–216.

COTTON, F. A. & WILKINSON, G. *Advanced Inorganic Chemistry*. 3rd Ed., Interscience. John Wiley & Sons, Inc. 1972. ISBN 0-471-17560-9.

DASH R. R.; BALOMAJUMDAR, C. & KUMAR, A. *Effect of Process Parameters on Adsorptive and Bio-removal of Cyanide Compounds, Contaminated Water, Proceedings*. 6th International Symposium on Southeast Asian Water Environment held at Bandung, Indonesia, October 29-31, 2008, pp. 97–104.

DIGERONIMO, M, & ANTONIE, A. Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100–21. *Appl. Environ. Microbiol.* 1976, vol. 31 p. 900–906.

DONATO, D.; NICHOLS, O.; POSSINGHAM, H.; MOORE, M.; RICCI, P. F. & NOLLER, B. N. A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife. *Environment International*. 2007, vol. 33, p. 974–984.

DUBEY, S. K. & HOLMES, D. S. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*. 1995, vol. 11, p. 257.

DUFFEY, S. S. *Cyanide and arthropods*. Vennesland, B., Conn, E. E., Knowles, C. J., Westerley, J., & Wissing, F., Eds. *Cyanide in Biology*. Academic Press, London. 1981, p. 385–414.

DUMESTRE, A.; CHONE, T.; PORTAL, J. M.; GERARD, M. & BERTHELIN, J. Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, vol. 63, No. 7, p. 2729-2734.

DURSUN, A. Y.; CALIK, A. & AKSU, Z. Degradation of ferrous (II) cyanide complexes by *Pseudomonas fluorescens*, *Proc. Biochem*. 1999, vol. 34, p. 901.

DURSUN, A. Y. & AKSU, Z. Biodegradation kinetics of ferrous (II) cyanide complexes by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor. *Process Biochem*. 2000, vol. 35, p. 615–622.

DZOMBAK, D. A.; RAJAT, S.; GHOSH, G. M. & WONG-CHONG, G. M. Cyanide in water and soil - Chemistry, Risk, and Management. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2006, p. 237–308.

EBBS, S. *Biological degradation of cyanide compounds*. In: *Environmental biotechnology*. 2004, vol. 15, p. 231–236.

EZZI-MUFADDAL, I. & LYNCH, J. M. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp., *Enz. Microbiol. Technol.* 2002, vol. 31, p. 1042.

FALLON, R. D.; COOPER, D. A.; SPEECE, R. & HENSON, M. Anaerobic biodegradation of cyanide under methanogenic conditions. *Appl Environ Microbiol.* 1991, vol. 57(6), p. 1656–1662.

FEDORAK, P. M. & HRUDEY, S. E. Cyanide transformation in anaerobic phenol-degrading methanogenic cultures, *Water Sci. Technol.* 1989, vol. 21, p. 67.

GIJZEN, H. J.; BERNAL, E. & FERRER, H. Cyanide toxicity and cyanide degradation in anaerobic wastewater treatment, *Water Res.* 2000, vol. 34, p. 2447.

GÓMEZ, P. L. Degradación de cianuros mediante oxidación química de efluentes industriales. Tesis de Maestría. Departamento de Química orgánica e Inorgánica. Universidad de Oviedo. Oviedo. 2012, p. 1–8.

GRIGOR'EVA, N. V.; KONDRAT'EVA, T. F.; KRASIL'NIKOVA, E. N. & KARAVAİKO, G. I. Mechanism of cyanide and thiocyanate decomposition by an association of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* strains. *Microbiology*. 2006, vol. 75, p. 266–273.

GUPTA, N.; BALOMAJUMDER, C. & AGARWAL, V. K. Enzymatic Mechanism and Biochemistry for Cyanide Degradation: A Review. *J. Hazard. Mater.* 2010, vol. 176, p.1–13.

GURBUZ, F.; HASAN, C. & AKCIL, A. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*, *J. Hazard. Mater.* 2009, vol. 16(1), p. 74–79.

HARRIS, H. E. & KNOWLES, C. J. Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. *J. Gen. Microbiol.* 1983, vol. 129, p. 1005-1011.

HENNY, C. J.; HALLOCK, R. J., & HILL, E.F. Cyanide and migratory birds at gold mines in Nevada, USA. *Ecotoxicology*. 1994, vol. 3, p. 45–58

HUERTAS, M. J.; SAEZ, L. P.; ROLDAN, M. D.; LUQUE-ALMARGO, V. M.; MARTINEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F.; MORENO-VIVIAN, C.; & GARCIA-GARCIA, I. Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas psuedoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor: Influence of pH, *Journal of Hazardous Materials*. 2010, vol. 179(13), p. 72–78.

KARAVAIKO, G. I.; KONDRAT'EVA, T. F.; SAVARI, E. E., GRIGOR'EVA, N. V. & AVAKYAN, Z. A. Microbial degradation of cyanide and thiocyanate, *Microbiology*. 2000, vol. 69, p. 167.

KAO, C. M.; LIU, J. K.; LOU, H. R.; LIN C. S. & CHEN S. C. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. 2003, *Chem.* 50: 1055 –1061.

KOBAYASHI, M.; NAGASAWA, T. & YAMADA, H. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: purification and characterisation. *Eur Jour. Biochem.* 1994, vol. 182, p.349–356.

KNOWLES, C. J. Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.* 1976, vol. 40, p. 652–680.

KUNZ, R. G. & CASEY, J. P. In : Environmental Management Handbook for the Hydrocarbon Processing Industries, Gulf Publishing Co., Houston, Tex. 1980, p. 20-28.

KWON, H. K.; WOO, S. H., & PARK, J. M. Thiocyanate degradation by *Acremonium strictum* and inhibition by secondary toxicants, *Biotech. Lett.* 2002, vol. 24, p. 1347.

LECHTENBERG, M. & NAHRSTEDT, A. Naturally occurring glycosides, in Cyanogenic Glycosides, Ikan, R., Ed., John Wiley & Sons, Chichester, U.K. 1999. Chapter 5.

LOGSDON, M.; HAGELSTEIN, K. & MUDDER, T. The Management of Cyanide in Gold Extraction. International Council on Metals and the Environment. 1999, p. 5.

LUQUE-ALMAGRO, V. M.; HUERTAS, M. J.; MARTÍNEZ, M.; MORENO, C.; ROLDÁN, M. D.; GARCÍA, L. J.; CASTILLO, F. & BLASCO, R. Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71(2), p. 940–947.

LUQUE-ALMAGRO, V. M. Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: Aplicaciones biotecnológicas. Analistas Económicos de Andalucía. VII Premio Unicaja de Investigación sobre Desarrollo Económico y Estudios Agrarios. 2006. ISBN: 84-95191-81-4.

MEYERS, P. R.; GOKOOL, P.; RAWLINGS, D. E. & WOODS, D. R. An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain, *J. Gen. Microbiol.* 1991, vol. 137(6), p. 1397–1400.

MONTENEGRO, R. Estudios sobre el impacto ambiental y sanitario de las minas de oro. El caso Cordón Esquel. Situación ambiental Argentina. 2003.

MUDDER, T. I.; BOTZ, M. & SMITH, A. *Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes*, 2nd ed., *Mining Journal Books Ltd.*, London, UK, 2001, ISBN 0-900117-51-6. Disponible en <<http://dana6.free.fr/3%20060713%20English%20Compendium.pdf>>

MUDDER, T. I. & BOTZ, M. M. Cyanide and society: A critical review. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*. 2004, vol. 4, p. 62–74.

NAHRSTEDT, A. Cyanide compounds in biology: Cyanogenesis and the role of cyanogenic compounds in insects. Ciba Foundation Symposium 140, 1988.

NAVA, A. F.; ELORZA, R. E.; URIBE, S. A. & PÉREZ, G. R. Análisis químico de cianuro en el proceso de cianuración: revisión de los principales métodos. *Rev. de Metalurgia*. 2007, vol. 43(1), p. 20–26

NAWAZ, M. S.; CHAPATWALA, K. D. & WOLFRAM, J. H. Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, vol. 55, p. 2267-2274.

NELSON, M. G.; KROEGER E. B. & ARPS P. J. Chemical and biological destruction of cyanide: comparative costs in a cold climate. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*. 1998, vol. 19, p. 217–26.

O'REILLY, C. & TURNER P. D. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes—a comparative study. *J. Appl. Microbiol.* 2003, vol. 95, p. 1161–1174.

OUdjeHANI, K.; ZAGURY, G. J. & DESCHENES L. Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings, *Applied Microbiology Biotechnology*. 2002, vol. 58, p. 409–415.

PATIL, Y. B. & PAKNIKAR, K. M. Development of a process for biodegradation of metal cyanides from waste waters. *Process Biochemistry*. 2000, vol. 35, p. 1139–1151.

PATIL, Y. B. *Development of a bioremediation technology for the removal of thiocyanate from aqueous industrial wastes using metabolically active microorganisms*. In: *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*. Ed. Yogesh B Patil and Prakash Rao. Intech Open Science Publishers, Croatia. 2013, p. 33-52. ISBN: 978-953-51-1200-6

PATIL, Y. B. & KULKARNI, A. R. *Environmental sensitivity and management of toxic chemical waste in mining industry with special reference to cyanide*. In: *High Performing Organizations: Needs and Challenges*, Tata McGraw Hill Publications, Part D. 2008, p. 183–196.

PARMAR, P.; SONI, A.; VYAS, K. & DESAI, P.V. Isolation and Characterization of cyanide degrading bacterial strains from contaminated sites. *International Journal of Environmental Sciences (IJES)*. 2012, vol. 2(4), p. 2025–2033.

PETTET, A. E. & MILLS, E. V. Biological treatment of cyanides with and without sewage, *J. Appl. Chem.* 1954, vol. 4, p. 434.

PERÚ, MINEM. 09/10/1996. Resolución Directoral N° 025-96-EM/DGAA, aprueba la publicación de las siguientes Guías Ambientales: Guía para el manejo de cianuro y Guía Ambiental para el manejo de reactivos y productos químicos.

RAINEY, F. & OREN, A. *Methods in Microbiology: Extremophiles*, 1 s.t. Edition, vol. 35, Chap. 18, 19. Academic Press, London. 2006, p. 439–510. ISBN: 978-0-12-521537-4.

RAYBUCK, S. A., *Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. Biodegradation*, 1992, vol. 3(1), p. 3–18.

RODGERS, P. B. & KNOWLES, C. J. Cyanide production and degradation during growth of *Chromobacterium violaceum*. *J. Gen. Microbiol.* 1978, vol. 108, p. 261–267.

RUIZ, A. Situación y tendencias minería aurífera y del mercado internacional del oro. Serie 71. Recursos naturales e infraestructura. CEPAL. Naciones Unidas. 2004, p. 51. Disponible en <<http://www.eclac.org/publicaciones/xml/1/15391/lcl2135e.pdf>>

SOLOMONSON, L. P. Cyanide as a metabolic inhibitor. In: *Cyanide in Biology*. Eds. Vannesland, B., Conn, E. E., Knowles, C. J., Westley, J., and Wissing, F. Academic Press, London. 1981. p. 11–28,

SOROKIN, D. Y.; TOUROVA, T. P.; LYSENKO, A. M., & KEUNEN, J. G. Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions, *Appl. Biochem. Microbiol.* 2001, 67, p. 528–538.

SOROKIN, D. Y.; VAN PELT, S.; TOUROVA, T. P.; TAKAICHI, S. & MUYZER, G. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*. 2007, vol. 153, p. 1157–1164.

SMITH, A. & MUDDER, T. *The Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes*, Mining Journal Books Ltd, London, 1991, p. 345.

TIAGO, I.; CHUNG, A. & VERISSIMO, A. Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, vol. 70, p. 7378–7387.

TOWILL, L. E.; DRURY, J. S.; WHITFIELD, B. L.; LEWIS, E. B.; GALYAN, E. L. & HAMMONS, A. S. Reviews of the environmental effects of pollutants: v. cyanide. U.S. Environ. Prot. Agency Rep. 1978, 600/1-78-027. 191 pp.

VASIL'EV, L. A.; VOROBYOV, A. A.; DZYUBINSKAYA, E. V.; NESOV, A. V.; SHESTAK, A. A. & SAMUILOV, V. D. Cyanide-Induced Death of Cells in Plant Leaves. *Biochemistry (Moscow)*. 2007. Vol. 72(5), p. 572–577.

WARE, G. C. & PAINTER, H. A. Bacterial utilization of cyanide, *Nature*, 1955, vol. 175, p. 900.

WISHNICK, M. & LANE, M. D. Inhibition of ribulose diphosphate carboxylase by cyanide: inactive ternary complex of enzyme ribulose diphosphate and cyanide *J. Biol. Chem.* 1969, vol. 244, p. 55–59.

WHITE, J. M.; JONES D. D.; HUANG, D. & GAUTHIER, J. Conversion of cyanide to formate and ammonia by a pseudomonad obtained from industrial wastewater. *Journal of Industrial Microbiology*. 1998, vol. 3, p. 263–272.

WONG-CHONG, G. M. Biological Degradation of Cyanide in Complex Industrial Wastewaters, In: *Biohydrometallurgy-89*, Eds., Salley, J., CANMET, 1989. p. 289–300.

X. ANEXOS

Anexo N° 1: Medios de Cultivo

1. Medio Mineral:

K_2HPO_4	1,0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/L
Minerales traza	0,2 mL
Buffer carbonato-bicarbonato	1000 mL

Ajustar pH 9,5 con HCl 1N y NaOH 1N. Esterilizar por filtración.

Buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M:

$NaHCO_3$	8,40 g/700 mL
Na_2CO_3	10,62 g/300 mL

Minerales traza (modificado de Nawaz *et al.*, 1989) en mg/L:

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6
$CaCl_2 \cdot H_2O$	2,6
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	6,0

Ajustar previamente con HCl 1N a pH 2,5 y esterilizar por filtración.

2. Agar cianuro:

NaCN	100 mg/L
Extracto de levadura	1 g/L
Agar	18 g/L
Medio Base Mineral	1000 mL

Ajustar previamente con NaOH 1N a pH 9,5 y esterilizar por filtración.

Anexo N° 2: Coloración de Gram de las cepas seleccionadas

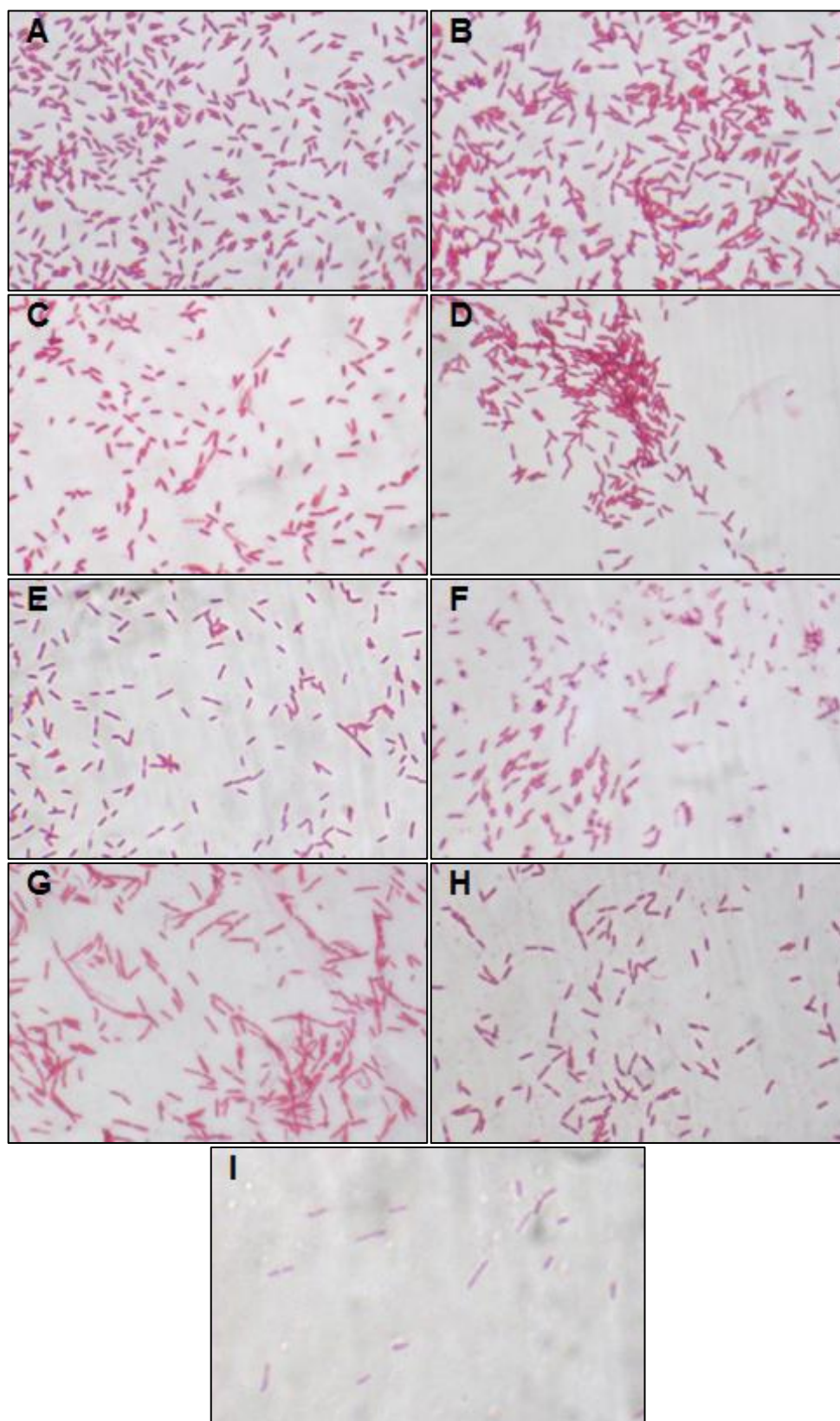


Figura 11. Coloración Gram de las cepas evaluadas: A. P-KING 8, B. P-NUT 9, C. P-NUT 1, D. P-CIAN 3, E. P-KING 12, F. P-KING 2, G. P-CIAN 2, H. P-NUT 6, I. P-KING 5.

Anexo N° 3: Identificación bioquímica de las cepas alcalófilas seleccionadas

Tabla 10. Identificación microbiana mediante el sistema API 20NE.

TEST	Valor	CEPAS		
		P-CIAN 2	P-NUT 1	P-KING 2
NO ₃	1	+	+	+
TRP	2	-	-	-
GLU	4	+	-	+
ADH	1	+	+	+
URE	2	+	-	-
ESC	4	-	-	-
GEL	1	+	-	+
PNPG	2	-	-	-
GLU	4	+	-	+
ARA	1	-	-	-
MNE	2	+	-	+
MAN	4	+	+	+
NAG	1	+	-	-
MAL	2	-	-	-
GNT	4	+	+	+
CAP	1	-	-	+
ADI	2	+	+	-
MLT	4	-	+	+
CIT	1	+	-	-
PAC	2	-	-	-
OX	4	+	+	+
CÓDIGO		5 3 5 6 5 2 5	1 1 0 4 4 6 4	5 1 5 6 4 5 4
API 20NE V7.0 (%ID.)		UNACCEPTABLE PROFIL	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (70.6) <i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (99.9)
Tween 80		-	Negativo	-
42°C		-	Positivo	-
Identificación Final		P-CIAN 2	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>

Anexo N° 4: Determinación de Cianuro Libre (CN⁻) por volumetría

A. Reactivos:

- Solución indicadora de yoduro de potasio al 5%: Disolver 5 g de KI en 95 ml de agua destilada.
- Solución estándar de nitrato de plata: Disolver 0,6522 g de AgNO₃ en agua y aforar a un litro. Mezclar bien. Guardar en botella oscura y proteger de la luz.
- Solución de hidróxido de sodio 1 M: Disolver lentamente y con cuidado 4 g de NaOH en agua destilada, esperar a que se enfríe y aforar a 100 mL.

B. Procedimiento:

1. Verificar que las muestras a las que se va a medir el cianuro estén alcalinas (pH>11). Si no es el caso, adicionar gotas de la solución de NaOH 1 M.
2. Verter con una pipeta volumétrica 10 ml de la muestra en un vaso de precipitado y adicionar tres gotas del indicador KI al 5%.
3. Titular con la solución estándar de nitrato de plata hasta cambio de color de transparente incoloro a amarillo claro opaco si está utilizando.
4. Registrar el volumen de solución utilizado.
5. Repetir el análisis en blanco (utilizando agua destilada como muestra).

C. Interpretación:

- 1 mL de la solución de nitrato de plata equivale a 20 mg/L de cianuro cuando se toma una alícuota de 10 ml de la muestra problema.

D. Cálculos:

$$\text{Concentración de cianuro (mg/L)} = (A - B) \times 20$$

A = mL de nitrato de plata empleados en titular 10 mL de la muestra problema.

B = mL de nitrato de plata empleados en titular 10 mL de agua.